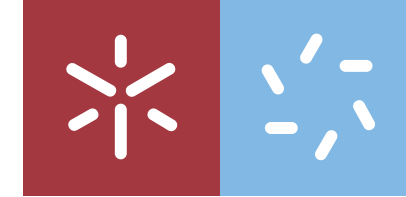


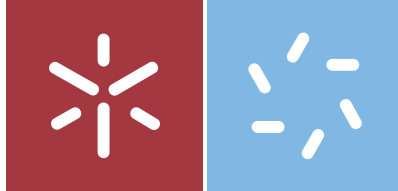


**Sondas fluorescentes e agentes
antifúngicos derivados do Nile Blue**

Rui Pedro Carvalho Lima de Sousa

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rui Pedro Carvalho Lima de Sousa

**Sondas fluorescentes e agentes
antifúngicos derivados do Nile Blue**

Tese de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria do Sameiro Torres Gonçalves
e da
Professora Doutora Maria João Marques Ferreira Sousa

DECLARAÇÃO

Nome: Rui Pedro Carvalho Lima de Sousa

Endereço eletrónico: pg31364 alunos.uminho.pt Telefone: 917481711

Bilhete de Identidade/Cartão do Cidadão: 14535429

Título da dissertação: Sondas fluorescentes e agentes antifúngicos derivados do Nile Blue.

Orientadoras:

Professora Doutora Maria do Sameiro Torres Gonçalves

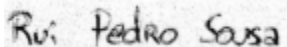
Professora Doutora Maria João Marques Ferreira Sousa Moreira

Ano de conclusão: 2018

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, 30 de outubro de 2018

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradecer à professora Doutora Sameiro Gonçalves. Por ter aceitado orientar-me neste que é o mais importante momento dos 5 anos de vida académica, pela imensa disponibilidade e paciência que sempre demonstrou, pela simpatia e ajuda ao longo deste ano e pelos conhecimentos transmitidos.

À professora Doutora Maria João Sousa, por toda a ajuda e orientação dada em todos os aspetos biológicos deste trabalho.

Ao Mestre João Canossa, pelo acompanhamento e companheirismo dado durante o progresso dos mesmos.

Ao Departamento de Química/Centro de Química e ao Departamento de Biologia/Centro de Biologia Molecular e Ambiental da Universidade do Minho por permitir a realização deste projeto nos seus laboratórios e pelas condições disponibilizadas.

À Dra. Elisa e à Dra. Vânia pela disponibilidade e rapidez na realização dos espetros de RMN.

Às colegas de laboratório, Mariana e Rita, pelo proporcionar de um ambiente de trabalho tão agradável, aspeto fulcral para o sucesso, mas ainda por toda a ajuda e companheirismo dados ao longo deste ano.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo destes 5 anos, porque esta tese é o terminar de um ciclo que ficou marcado por eles. Pela companhia, pela amizade, pela disponibilidade e pela ajuda; sem eles acho que nada disto seria possível.

Por último, agradecer à minha família. Ao meu pai, pela compreensão e apoio dados ao longo de todo este percurso; à minha mãe, pela insistência em fazer-me ver que podia ser e fazer melhor; à minha irmã, pelo interesse e preocupação sempre demonstrados.

A todos, um enorme obrigado!

RESUMO

Atendendo ao conhecido interesse a nível biológico das sulfonamidas e de benzo[*a*]fenoxazinas, assim como à experiência do grupo de trabalho nesta última família de compostos, decidiu-se efetuar a síntese de uma nova série de benzo[*a*]fenoxazinas, derivadas do Nile Blue, possuindo um grupo sulfonamida como substituinte no sistema policíclico. A escolha deste grupo como substituinte teve como base trabalho publicado anteriormente que mostrou que uma benzo[*a*]fenoxazina com o grupo metilfenilsulfonamido na amina da posição 5 apresentava um interessante potencial antifúngico (MIC 30 μ M em *S. cerevisiae*). A inexistência de outros derivados semelhantes motivou a exploração de diferentes combinações deste grupo com outros substituintes para otimização da atividade desta classe de compostos. Por outro lado, benzo[*a*]fenoxazinas possuindo nas aminas das posições 5 e 9 diferentes combinações de substituintes apresentam propriedades fotofísicas que permitem a sua aplicação como sondas de fluorescência na região do infravermelho próximo, designadamente em meio biológico, pelo que se torna fundamental conhecer o comportamento destes compostos em meio aquoso, especificamente em condições fisiológicas simuladas.

Assim, neste trabalho efetuou-se a síntese de seis novas benzo[*a*]fenoxazinas possuindo como substituintes na amina da posição 5 um grupo sulfonamida e na amina da posição 9 grupos propilo (um ou dois), ou um grupo etilo em simultâneo com um grupo metilo na posição 10 do sistema policíclico para comparação de resultados. Para além disso, foram também sintetizadas as benzo[*a*]fenoxazinas análogas às anteriores, com o mesmo tipo de substituição na posição 9 mas sem o grupo sulfonamida na posição 5, apenas com o grupo amina (sem substituintes), ou com o grupo (3-aminopropil)amino para avaliação do efeito do grupo sulfonamida na atividade biológica. A caracterização dos compostos sintetizados foi efetuada pelas técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C .

Foram avaliadas as propriedades fotofísicas dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio obtidos pelas técnicas de espectroscopia de UV/Vis e de fluorescência, tendo sido obtidos os espetros de absorção e emissão de fluorescência em etanol, água e a diferentes valores de pH, designadamente 3, 5, 7,4 e 8,5, relevantes a nível fisiológico. A atividade antiproliferativa dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio sintetizados foi determinada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072, utilizando o método de microdiluição descrito para os testes de suscetibilidade antifúngica em leveduras.

Palavras-Chave: Nile Blue, benzo[*a*]fenoxazinas, sulfonamidas, sondas fluorescentes, agentes antifúngicos.

ABSTRACT

Considering the known biological interest of sulfonamides and benzo[*a*]phenoxazines, as well as the experience of the research group in the latter family of compounds, it was decided to synthesize a new series of benzo[*a*]phenoxazines, Nile Blue derivatives, having a sulfonamide as a substituent in the polycyclic system. The choice of this group was based on previous work showing that a benzo[*a*]phenoxazine with methylphenylsulfonamido at 5-position displayed an interesting antifungal activity (MIC 30 μ m in *S. cerevisiae*). However, the lack of comparative results motivated the exploitation of different combinations of this group with other substituents for optimization of the activity of this class of compounds. On the other hand, benzo[*a*]phenoxazines possessing in the 5- and 9- amine positions different combinations of substituents show photophysical properties that allow its application as fluorescence probes in the region of near infrared, namely in biological environment, becoming extremely important to know the behavior of these compounds in aqueous medium, specifically at simulated physiological conditions.

Thus, in this work is presented the synthesis of six new benzo[*a*]phenoxazines having as substituent at the 5-position a sulfonamide group and at the 9-position propyl groups (one or two), or an ethyl group with a methyl group at 10-position of the polycyclic system for the comparison of results. In addition, benzo[*a*]phenoxazines analogous to the above were also synthesized with the same type of substitution at the 9-position but without sulfonamide group at the 5-position, with only amine group (without substituents), or with (3-aminopropyl)amino group to evaluate the effect of sulfonamide group on biological activity. Full characterization of all compounds was carried out by IR, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

Photophysical properties of synthesized benzo[*a*]phenoxazinium chlorides were evaluated by UV/Vis and fluorescence spectroscopy. Absorption and fluorescence emission spectra were obtained in ethanol, water, and at different physiologically relevant pH values, namely 3, 5, 7.4 and 8.5. The antiproliferative activity of the synthesized benzo[*a*]phenoxazinium chlorides was determined using *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 and the microdilution method described for antifungal susceptibility tests in yeast.

Keywords: Nile Blue, benzo[*a*]phenoxazines, sulfonamides, fluorescent probes, antifungal agents.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Agradecimentos..... | iii |
| Resumo..... | v |
| Abstract..... | vii |
| Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrônimos | xi |
| Lista de Figuras..... | xv |
| Lista de Esquemas | xvii |
| Lista de Tabelas | xix |
| Nota Introdutória | xxi |
| Comunicações..... | xxi |
| 1. Introdução teórica..... | 1 |
| 1.1 Fluorescência | 2 |
| 1.2 Sondas fluorescentes para marcação biológica | 5 |
| 1.3 Benzo[<i>a</i>]fenoxazinas..... | 7 |
| 1.3.1 Nomenclatura e características..... | 7 |
| 1.3.2 Síntese..... | 9 |
| 1.3.3 Propriedades fotofísicas..... | 14 |
| 1.3.4 Aplicações..... | 16 |
| 1.4 Sulfonamidas | 18 |
| 1.4.1 Síntese..... | 18 |
| 1.4.2 Aplicações..... | 20 |
| 1.5 Plano e objetivos | 23 |
| 2. Resultados e discussão..... | 25 |
| 2.1 Síntese dos derivados <i>N</i> -substituídos do 3-aminofenol 2a-b | 26 |
| 2.2 Síntese dos derivados nitrosados 3a-c..... | 26 |
| 2.3 Síntese dos derivados <i>N</i> -substituídos da naftalen-1-amina 5, 6a-c e 7 | 27 |
| 2.4 Síntese dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a-d | 29 |
| 2.5 Caracterização fotofísica dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b | 35 |
| 2.5.1 Estudos de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b | 35 |
| 2.5.2 Estudos de fluorescência dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b | 43 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.6 | Ensaio de atividade antifúngica dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b | 49 |
| 3. | Parte experimental..... | 53 |
| 3.1 | Procedimentos gerais | 54 |
| 3.2 | Síntese dos derivados <i>N</i> -substituídos do 3-aminofenol 2a-b | 55 |
| 3.3 | Síntese dos derivados nitrosados 3a-c..... | 56 |
| 3.4 | Síntese dos derivados <i>N</i> -substituídos da naftalen-1-amina 5, 6a-c e 7 | 57 |
| 3.5 | Síntese dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a-d | 60 |
| 3.6 | Caraterização fotofísica dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b..... | 73 |
| 3.7 | Ensaio de atividade antifúngica dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b | 73 |
| 3.7.1 | Preparação das suspensões celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 74 |
| 3.7.2 | Preparação das soluções dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a,b | 74 |
| 3.7.3 | Ensaio e leitura..... | 74 |
| 4. | Conclusão e perspectivas futuras | 75 |
| | Bibliografia | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

Abs_{comp} – absorvância do composto

Abs_p – absorvância do padrão

BODIPY – 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

C153 – cumarina 153

CA – anidrase carbônica

COX2 – ciclooxigenase 2

d – duplete

DCM – diclorometano

dd – duplo duplete

DMSO – dimetilssulfóxido

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido hexadeuterado

DNA – ácido desoxiribonucléico (do inglês *desoxyribonucleic acid*)

et al. – *et alia* (do latim, referência a outras pessoas)

EtOH – etanol

F_{comp} – área da curva de fluorescência do composto

F_p – área da curva de fluorescência do padrão

FRET – transferência por ressonância de energia de fluorescência (do inglês *fluorescent resonance energy transfer*)

GFP – proteína fluorescente verde (do inglês *green fluorescent protein*)

HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*)

HMBC – correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, a longa distância (*heteronuclear multiple bond coherence*)

HMQC – correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional (*heteronuclear multiple quantum coherence*)

Hz – hertz

IMC – indometacino

IV – infravermelho

J – constante de acoplamento (em hertz)

m – multiplete

m-CPBA – ácido *meta*-cloroperoxibenzóico

MeOH – metanol

MIC – concentração mínima inibitória (do inglês *minimum inhibitory concentration*)

n_{comp} – índice de refração do solvente do composto

nf_{abs} – número de fótons absorvidos

nf_{emi} – número de fótons emitidos

NIR – infravermelho Próximo (do inglês *near infrared*)

n_p – índice de refração do solvente do padrão

OX1 – oxazina 1

p.f. – ponto de fusão

PABA – ácido *para*-aminobenzóico (do inglês *para-aminobenzoic acid*)

PBS – tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

PDT – terapia fotodinâmica (do inglês *photodynamic therapy*)

PFP – pentafluorofenil

ppm – partes por milhão

q – quarteto

R101 – rodamina 101

Rf – fator de retenção (do inglês *retention factor*)

RMN – ressonância magnética nuclear

s – singleto

S_0 – estado fundamental

S_1 – primeiro estado excitado singleto

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

t – tripleto

T_1 – primeiro estado excitado tripleto

TCP – triclorofenil

TFA – ácido trifluoroacético

TLC – cromatografia em camada fina (do inglês *thin layer chromatography*)

UV – ultravioleta

Vis – visível

δ – desvio químico

ϵ – coeficiente de absorvidade molar

η – rendimento (em %)

λ_{abs} – comprimento de onda de absorção máxima

λ_{emi} – comprimento de onda de emissão máxima

λ_{exc} – comprimento de onda de excitação

Φ_{F} – rendimento quântico relativo de fluorescência

Φ_{Fp} – rendimento quântico de fluorescência do padrão

Φ_{Fcomp} – rendimento quântico relativo de fluorescência de um composto

$\Delta\lambda$ – desvio de Stokes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de Jablonski. | 3 |
| Figura 2. Estrutura da fluoresceína 1 | 4 |
| Figura 3. Estrutura da rodamina B 2 e da cumarina 3 | 5 |
| Figura 4. Estrutura da GFP. | 6 |
| Figura 5. Estrutura de uma cianina 4 | 7 |
| Figura 6. Estrutura do BODIPY 5 | 7 |
| Figura 7. Estruturas da oxazina 6 , fenoxazina 7 e benzo[<i>a</i>]fenoxazina 8 | 8 |
| Figura 8. Estrutura do Meldola's Blue 9 , Nile Red 10 e Nile Blue 11 | 9 |
| Figura 9. Posições mais utilizadas para introduzir diferentes substituintes no núcleo de benzo[<i>a</i>]fenoxazina. | 9 |
| Figura 10. Síntese de derivados do Nile Blue 24a-f sob irradiação de microondas. | 12 |
| Figura 11. Síntese de derivados do Nile Blue 25a-g por ultrassons. | 12 |
| Figura 12. Derivados do Nile Blue 26a,b com cadeias alquílicas de 20 carbonos. | 13 |
| Figura 13. Derivados do Nile Blue 27a-d ligados a aminoácidos. | 13 |
| Figura 14. Derivado Nile Blue-IMC 28 possuindo a hexanodiamina como grupo de ligação. | 14 |
| Figura 15. Estrutura de um derivado de benzo[<i>a</i>]fenoxazina 29 contendo julolidina. | 14 |
| Figura 16. Estruturas da forma catiónica (ácida) e neutra (básica) do Nile Blue 11 | 15 |
| Figura 17. Estrutura do Prontosil 39 , sulfanilamida 40 e PABA 41 | 20 |
| Figura 18. Estruturas da acetazolamida 42 e diclorofenamida 43 | 21 |
| Figura 19. Estrutura da cloroquinoxalina 44 | 21 |
| Figura 20. Estrutura da sulfonamida E7070 45 , em ensaios clínicos avançados. | 22 |
| Figura 21. Estruturas do amprenavir 46 e do tipranavir 47 | 22 |
| Figura 22. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em etanol. | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura 23. Espetros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em etanol acidificado com TFA. | 37 |
| Figura 24. Espetros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em água..... | 39 |
| Figura 25. Espetros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 3. | 41 |
| Figura 26. Espetros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 5. | 41 |
| Figura 27. Espetros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 7,4. | 42 |
| Figura 28. Espetros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 8,5. | 42 |
| Figura 29. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em etanol..... | 44 |
| Figura 30. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em etanol acidificado com TFA. | 45 |
| Figura 31. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em água..... | 46 |
| Figura 32. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 3. | 47 |
| Figura 33. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 5. | 48 |
| Figura 34. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 7,4. | 48 |
| Figura 35. Espetros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 8,5. | 49 |
| Figura 36. Correlação entre os valores de Log P e de MIC obtidos para os compostos 8a-e , 9a,c,d e 10a,b | 52 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Síntese dos derivados do Nile Blue 16a ou Nile Red 16b através do derivado nitrosado do 3-aminofenol 14 e derivado do naftaleno 15a,b | 10 |
| Esquema 2. Síntese de derivados do Nile Blue 23a-c através de um intermediário azo 21 ou 22 | 11 |
| Esquema 3. Síntese de sulfonamidas 32 partindo de um cloreto de sulfonilo 31 e uma amina 30 ... | 18 |
| Esquema 4. Síntese de sulfonamidas 34 através de sulfenamidas 33 | 19 |
| Esquema 5. Síntese de sulfonamidas 38 através de ésteres de sulfonato 35 e 36 | 19 |
| Esquema 6. Síntese dos derivados <i>N</i> -substituídos do 3-aminofenol 2a,b | 26 |
| Esquema 7. Síntese dos derivados nitrosados 3a-d | 27 |
| Esquema 8. Síntese dos derivados <i>N</i> -substituídos da naftalen-1-amina 5 , 6a-c e 7 | 28 |
| Esquema 9. Síntese dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e | 30 |
| Esquema 10. Síntese dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 9a-d | 31 |
| Esquema 11. Síntese e tentativas de síntese dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 10a-d | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Dados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em etanol e em etanol acidificado com TFA. | 36 |
| Tabela 2. Dados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em água. | 38 |
| Tabela 3. Dados de absorção dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 3, 5, 7,4 e 8,5. | 40 |
| Tabela 4. Dados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em etanol e em etanol acidificado com TFA. | 44 |
| Tabela 5. Dados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b em água. | 45 |
| Tabela 6. Dados de emissão dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b a pH 3, 5, 7,4 e 8,5. | 47 |
| Tabela 7. Valores de MIC dos cloretos de benzo[<i>a</i>]fenoxazínio 8a-e , 9a-d e 10a,b para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4072. | 51 |

NOTA INTRODUTÓRIA

A numeração dos compostos do Capítulo 1 é independente da numeração utilizada nos restantes capítulos. A numeração das figuras, tabelas, esquemas e equações é contínua ao longo de toda a dissertação.

COMUNICAÇÕES

1. Sousa, R. P.; Sousa, M. J.; Gonçalves, M. S. T. “New Nile Blue sulfonamide derivatives: synthesis, characterization and photophysics”, comunicação em painel (P30), *V Encontro em Técnicas de Caracterização e Análise Química*, Braga, Portugal, 4 maio 2018
2. Sousa, R. P.; Ferreira, J. C.; Sousa, M. J.; Gonçalves, M. S. T. “New Nile Blue derivatives as NIR fluorescent probes and antifungal agents”, comunicação eletrónica, *The 22nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-22)*, 15 novembro a 15 dezembro 2018, aceite a 18 outubro 2018 (submission ID:sciforum-022354).

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1 Fluorescência

A fluorescência é um processo fotofísico associado à emissão de radiação através do relaxamento de um eletrão. Quando uma molécula relaxada absorve um fóton, um eletrão é promovido do seu estado fundamental (S_0) para um estado excitado de energia superior, não ocorrendo qualquer alteração na estrutura da molécula. Cada um destes níveis eletrónicos possui vários níveis vibracionais para os quais a transição pode ocorrer. O fóton de menor energia absorvido pela molécula tem uma energia igual à diferença entre S_0 e o primeiro estado excitado S_1 . Fótons com energia superior podem originar a excitação do eletrão para níveis eletrónicos de energia superior a S_1 . O eletrão pode retornar ao seu estado fundamental por vários processos, radiativos ou não-radiativos. Normalmente esta reversão é rápida (10^{-12} a 10^{-10} s) e ocorre devido a movimentos de rotação e vibração da molécula, através de processos não-radiativos. No entanto, em moléculas com um sistema rígido e conjugado, estes movimentos não acontecem com tanta facilidade, levando a um relaxamento do eletrão por outros processos, através da emissão de radiação. Os processos radiativos de retorno ao estado fundamental através da emissão de fótons são a fluorescência e a fosforescência. A fluorescência envolve a emissão de radiação através da passagem direta do estado excitado singleto S_1 para o estado fundamental. No entanto, pode ainda ocorrer a inversão do spin do eletrão no estado excitado, passando para um estado excitado tripleto T_1 . O relaxamento radiativo de um eletrão neste estado para S_0 é designado de fosforescência.¹

Os processos não-radiativos de relaxamento dos eletrões levam a um decaimento para o estado fundamental sem emissão de radiação e ocorrem sempre, ainda que em menor extensão nas moléculas mais conjugadas. Estes processos vão levar a uma diminuição da energia dos fótons emitidos face aos fótons absorvidos, resultando num aumento do seu comprimento de onda. A diferença de comprimentos de onda dos fótons emitidos e absorvidos designa-se desvio de Stokes.¹

Na Figura 1 é apresentado o diagrama de Jablonski, que mostra todos estes processos que ocorrem numa molécula depois da absorção de um fóton.

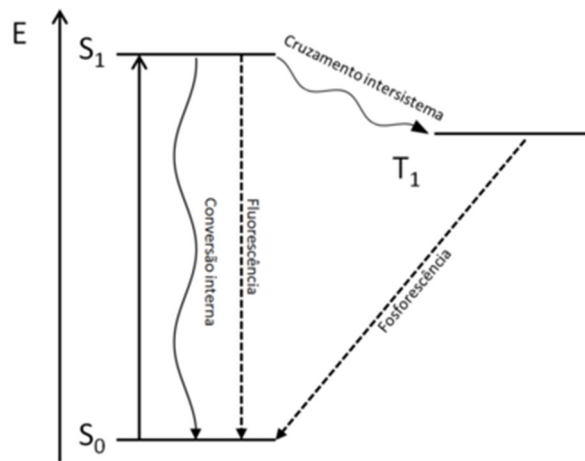


Figura 1. Diagrama de Jablonski.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fcomp}) é uma característica de cada molécula fluorescente. É determinado pela razão entre o número de fótons emitidos (nf_{emi}) e o número de fótons absorvidos (nf_{abs}) (Equação 1). Assim sendo, o rendimento quântico de fluorescência de uma molécula que não emita fluorescência será 0, sendo que este valor é sempre inferior a 1 devido à existência de processos não radiativos.

$$\Phi_{Fcomp} = \frac{nf_{emi}}{nf_{abs}} \quad \text{Equação 1}$$

Em condições práticas, o rendimento quântico de fluorescência é determinado de forma relativa, comparando com o valor de um padrão de fluorescência (Φ_{Fp}), uma molécula cujo rendimento seja conhecido, sendo usados dados obtidos pelos espectros de absorção e de fluorescência do composto em estudo (Abs_{comp} - absorvância da solução do composto em estudo no comprimento de onda de excitação respectivo e F_{comp} - área abaixo da curva de fluorescência do composto em estudo) e do padrão utilizado (Abs_p - absorvância da solução de padrão no comprimento de onda de excitação do padrão e F_p - área abaixo da curva de fluorescência do padrão), pela Equação 2, sendo n_p o índice de refração do solvente do padrão e n_{comp} o índice de refração do solvente do composto.

$$\frac{\Phi_{Fcomp}}{\Phi_{Fp}} = \frac{Abs_p \times F_{comp} \times n_p^2}{Abs_{comp} \times F_p \times n_{comp}^2} \quad \text{Equação 2}$$

O padrão de fluorescência é escolhido em função da molécula em estudo, tendo em conta a zona da sua banda de emissão. Alguns dos padrões de fluorescência mais conhecidos são a cumarina 153 (C153) para comprimentos de onda mais baixos, a rodamina 101 (R101), que apresenta um rendimento quântico de fluorescência muito próximo de 1,² ou a oxazina 1 (OX1),³ que emite já na zona do infravermelho próximo.

Os fluoróforos são moléculas, ou partes de moléculas, que possuem a capacidade de emitir fluorescência. Caracterizam-se por possuírem um sistema π altamente conjugado, normalmente com anéis aromáticos. Um bom fluoróforo deve possuir certas características como um desvio de Stokes razoável, para não ocorrer interferência da absorção com a emissão, um rendimento quântico de fluorescência elevado e um coeficiente de extinção molar (ϵ) também elevado. Para testes com material biológico é importante possuir também um comprimento de onda de emissão elevado de forma a não coincidir com a emissão natural das amostras.

Um dos fluoróforos mais conhecidos é a fluoresceína **1**, uma molécula com um sistema π altamente conjugado, descoberta por Bayer (Figura 2).⁴ Esta molécula é um xanteno, classe de compostos aromáticos usados normalmente como corantes, e apresenta um rendimento quântico de fluorescência bastante elevado sendo que, para além dos usos como corante, indicador de pH ou marcador para microscopia de fluorescência, tem ainda outras aplicações ao nível da oftalmologia⁵ e neurocirurgia.⁶

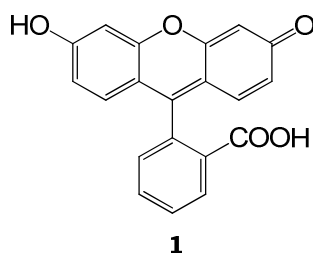


Figura 2. Estrutura da fluoresceína **1**.

Outros exemplos de fluoróforos muito usados são as rodaminas **2**, as cumarinas **3** (Figura 3) e as proteínas fluorescentes. Tal como a fluoresceína, todas as moléculas fluorescentes apresentam uma gama muito ampla de aplicações; no entanto, uma das suas mais importantes aplicações é como sondas fluorescentes para marcação biológica.

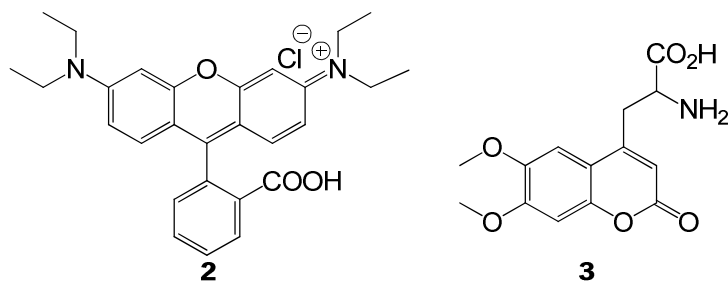


Figura 3. Estrutura da rodamina B **2** e da cumarina **3**.

1.2 Sondas fluorescentes para marcação biológica

A marcação de biomoléculas pode ser efetuada pela utilização de material radioativo ou de moléculas com absorção e/ou fluorescência na zona UV/Vis/NIR (*near infrared*). Nos últimos tempos, a marcação biológica com moléculas fluorescentes tem sido cada vez mais utilizada devido a melhorias constantes na eficiência das técnicas de análise e instrumentação usada. Assim, os compostos fluorescentes assumem-se como uma excelente área de investigação neste âmbito.⁷

As proteínas fluorescentes são um dos tipos de moléculas com emissão fluorescente mais utilizadas em marcação. Pelo facto de serem codificadas por genes e, desta forma, poderem ser incorporadas no genoma de células, são produzidas endogenamente e conseguem monitorizar alterações a nível de localização ou estrutura de certos alvos sem necessidade de marcação com outras sondas fluorescentes. Entre elas está a GFP (*Green Fluorescent Protein*), uma proteína isolada de uma espécie de medusa do Oceano Pacífico por Osamu Shimomura em 1962, cujo gene foi isolado e é utilizado para marcações intrínsecas de organelos celulares (Figura 4).⁸ Esta proteína tem uma vasta gama de aplicações na marcação de outras proteínas e alvos celulares.

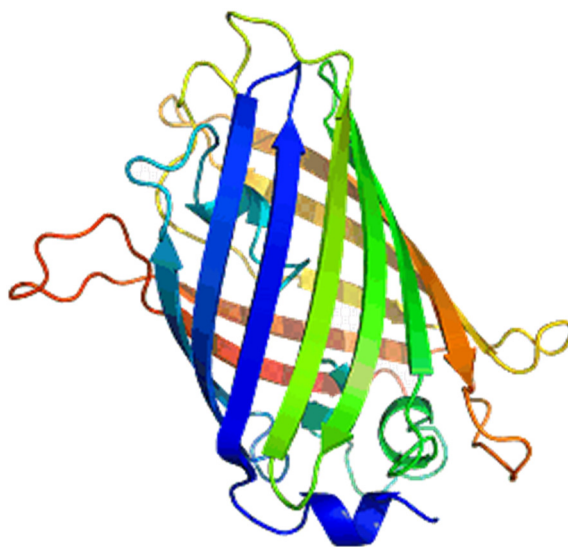


Figura 4. Estrutura da GFP.

Os fluoróforos orgânicos extrínsecos, apesar de não poderem ser incorporados no genoma celular, apresentam a vantagem de poderem ser modificados de forma a adaptar a sua estrutura ao local de ligação sob análise. Várias moléculas têm vindo a ser estudadas e alteradas de forma a melhorarem a sua capacidade de marcação de diferentes biomoléculas. Um exemplo é o trabalho de Wei *et al.* em que foram sintetizadas cumarinas possuindo um grupo protetor que impede que a molécula fluoresça continuamente e que foram usadas para deteção de cisteínas e homo cisteínas. Estes aminoácidos clivam a ligação entre a cumarina e o grupo protetor, tornando o núcleo de cumarina capaz de emitir fluorescência. Esta sonda provou ainda ser seletiva para a cisteína e a homocisteína face a outras moléculas, como a glutathione.⁹

Como referido, uma das características mais importantes para uma molécula utilizada como marcador biológico é o elevado comprimento de onda de emissão, de forma a evitar interferências com a fluorescência natural do material biológico. Deste modo, o interesse em novos fluoróforos ou alterações estruturais dos já existentes que permitam a emissão nessa região do espectro eletromagnético é cada vez maior. Vários tipos de moléculas já conhecidas emitem na zona do NIR como as referidas fluoresceínas e rodaminas, assim como as cianinas **4** (Figura 5) ou os fluoróforos de BODIPY **5**.⁷

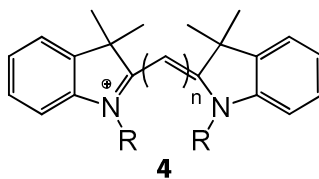


Figura 5. Estrutura de uma cianina **4**.

Estes últimos baseiam-se na molécula de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno **5** e são dos fluoróforos mais recentemente descritos na literatura (Figura 6).¹⁰ Estes compostos apresentam propriedades excelentes como coeficiente de extinção molar e rendimento quântico de fluorescência elevados em vários meios. Podem ser usados para marcar proteínas,¹¹ sacáridos,¹² lípidos¹³ ou até incorporar-se em cadeias de ácidos nucleicos, modificando os nucleótidos. Dziuba *et al.* sintetizaram análogos de nucleósidos trifosfatados com BODIPY e verificaram que estes eram incorporados no DNA pela DNA polimerase, não se verificando qualquer diminuição na sua fluorescência.¹⁴

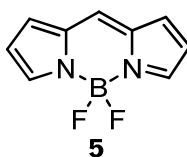


Figura 6. Estrutura do BODIPY **5**.

Alguns dos compostos que emitem a comprimentos de onda elevados podem não ser adequados para a marcação fluorescente de biomoléculas por apresentarem limitações em aspetos importantes, tais como na hidrossolubilidade ou estabilidade. Uma das famílias de compostos que emitem da zona do NIR e que cumprem os requisitos fundamentais para este tipo de aplicação são as benzofenoxazinas.

1.3 Benzo[*a*]fenoxazinas

1.3.1 Nomenclatura e características

As benzofenoxazinas são compostos derivados das fenoxazinas, por sua vez derivadas da 1,4-oxazina. Esta oxazina **6** é um composto cíclico com um átomo de oxigénio e um átomo de nitrogénio nas posições 1 e 4. As fenoxazinas **7** são compostos tricíclicos com dois anéis de benzeno fundidos nas faces laterais da 1,4-oxazina e as benzofenoxazinas, por sua vez, apresentam outro núcleo de benzeno numa das faces da fenoxazina. As benzo[*a*]fenoxazinas **8** possuem este anel na face *a* da fenoxazina (Figura 7).

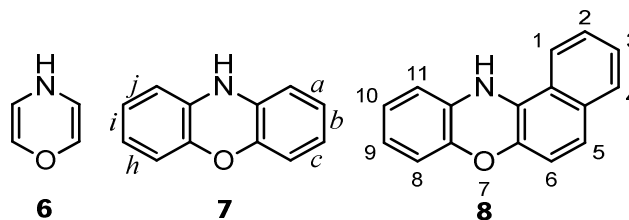


Figura 7. Estruturas da oxazina **6**, fenoxazina **7** e benzo[*a*]fenoxazina **8**.

As benzo[*a*]fenoxazinas caracterizam-se por possuírem comprimentos de onda de absorção e, consequentemente, de emissão muito elevados. Emitindo normalmente na zona do NIR, cumprem um dos principais requisitos para atuarem como sondas fluorescentes para marcações biológicas.

A primeira molécula desta classe com fluorescência significativa descoberta foi o Meldola's Blue **9** (Figura 8).¹⁵ Este composto apresenta uma amina terciária como substituinte na posição 9 e é muito pouco solúvel em água, pelo que não tem sido usado como sonda em material biológico, sendo contudo bastante usado como corante em várias indústrias. É usado ainda como componente de alguns sensores redox.^{16,17}

Em 1896, Möhlau e Uhlmann relataram pela primeira vez a síntese de duas outras moléculas desta classe, o Nile Red **10** e o Nile Blue **11** (Figura 8).¹⁸ O Nile Red **10** caracteriza-se por apresentar uma amina terciária na posição 9, com dois substituintes etilo, e um grupo carbonilo na posição 5. Devido a esta alteração, o Nile Red **10** e os seus derivados são referidos como benzo[*a*]fenoxazinonas. Estes compostos caracterizam-se por possuírem uma elevada fluorescência em meios apolares, mas apresentam uma fraca solubilidade em água. Desta forma, são bastante usados em estudos de ambientes lipofílicos.

O Nile Blue **11** é muito semelhante ao Nile Red **10**, variando apenas no substituinte presente na posição 5, sendo neste caso uma amina. Apresentando carga positiva, esta molécula e os seus derivados são também designados de sais de benzo[*a*]fenoxazínio, sendo o anião normalmente um haleto correspondente ao ácido de Lewis utilizado na síntese. Esta molécula é bastante mais polar, sendo solúvel em água, possibilitando assim a sua utilização no estudo de material biológico em ambientes mais hidrofílicos.

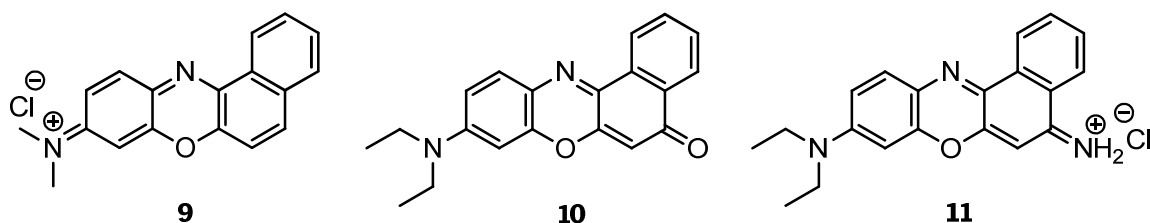


Figura 8. Estrutura do Meldola's Blue **9**, Nile Red **10** e Nile Blue **11**.

A síntese, as propriedades fotofísicas e as aplicações destas duas benzo[*a*]fenoxazinas e dos seus derivados são apresentados de seguida.

1.3.2 Síntese

O Nile Red **10** foi inicialmente sintetizado através do Nile Blue **11**, sendo este refluxado em ácido sulfúrico. No entanto, para ambas as moléculas e seus derivados, são requeridos normalmente um derivado de aminofenol nitrosado e um derivado de naftaleno. A síntese desses derivados envolve vários passos, dependendo dos substituintes usados, e requer normalmente purificações por cromatografia em coluna dos intermediários bem como dos produtos finais. A incorporação de substituintes no núcleo de benzo[*a*]fenoxazina é bastante importante de modo a permitir a obtenção de derivados com diferentes características, entre as quais uma maior solubilidade em água ou maior fotoestabilidade. As posições 2, 5 e 9 são as mais utilizadas para introduzir diferentes grupos no esqueleto do Nile Blue **11**, enquanto o Nile Red **10** está limitado principalmente às posições 2 e 9. Casos de substituições noutras posições já foram relatados, mas com menor frequência. A introdução de um grupo metilo na posição 10 é usada regularmente para ajudar à formação de aminas secundárias na posição 9, impedindo a dialquilação da amina, atuando assim como bloqueador por impedimento estérico (Figura 9).

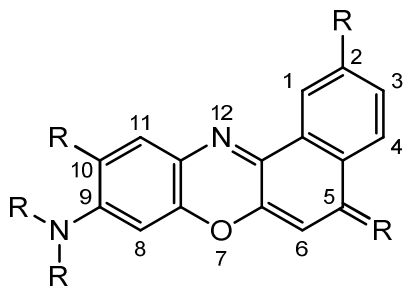
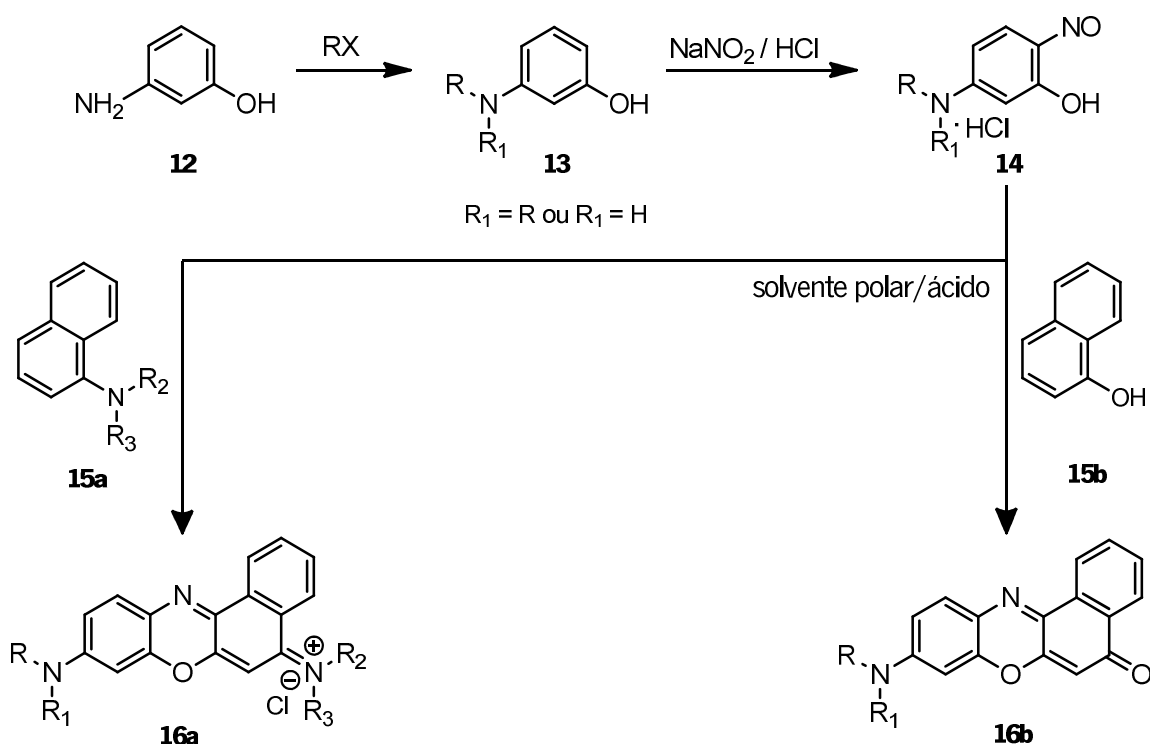


Figura 9. Posições mais utilizadas para introduzir diferentes substituintes no núcleo de benzo[*a*]fenoxazina.

A síntese através de um derivado nitrosado **14** é efetuada dissolvendo o derivado do aminofenol com os substituintes desejados (**13**) num solvente polar, normalmente um álcool com baixa massa molecular, como o etanol ou metanol, adicionando ácido clorídrico, a 0°C. O nitrito de sódio dissolvido em água é adicionado e, em ambiente ácido, é desidratado formando o ião nitrosónio, um ião bastante eletrofílico. A amina, sendo o grupo mais nucleofílico presente na solução, ataca este ião formando uma nitrosamina, mas o grupo nitroso não irá ficar nessa posição uma vez que é direcionado para a posição *orto* ao grupo fenol e *para* à amina devido a um rearranjo de Fischer-Hepp.¹⁹ O produto final é um sal de hidrocloreto.

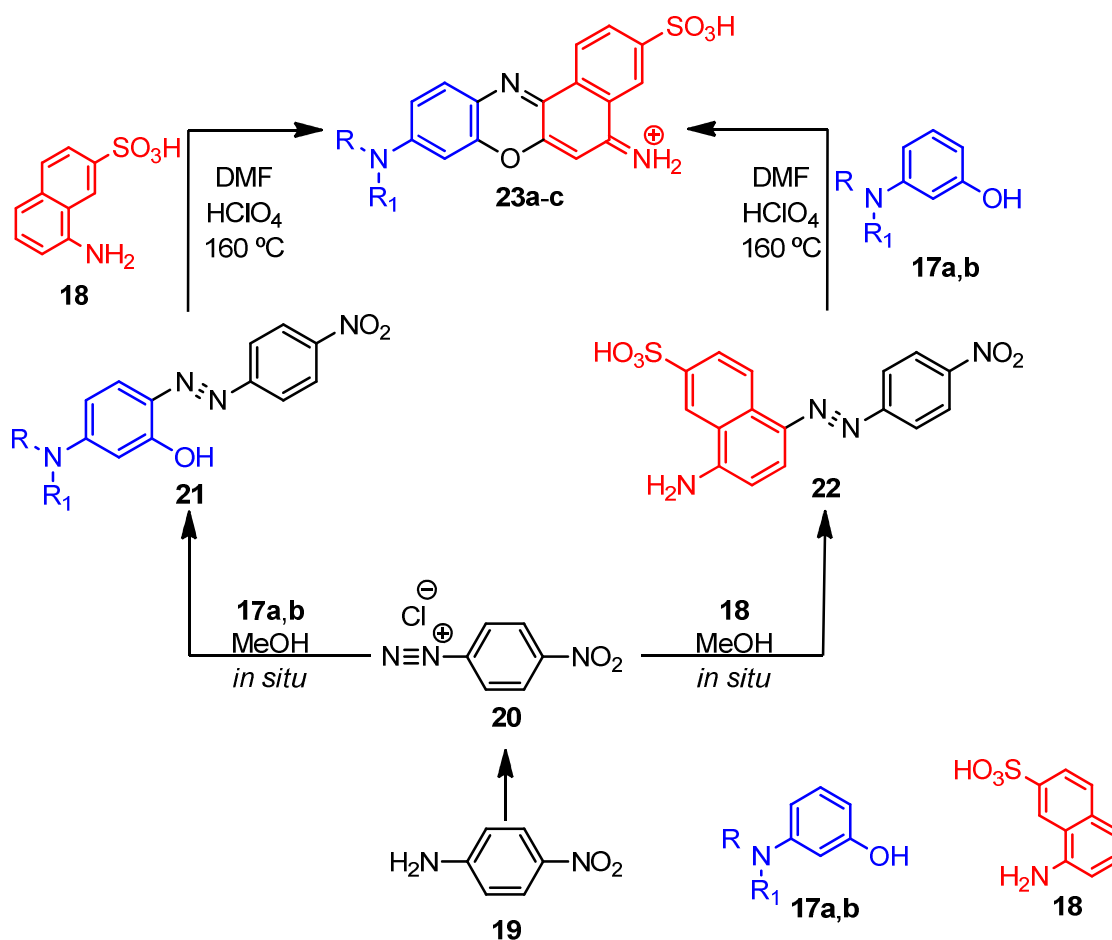
Por aquecimento do aminofenol nitrosilado, em condições ácidas, com um derivado de aminonaftaleno **15a** ou hidroxinaftaleno **15b** é obtido um derivado do Nile Blue **16a** ou do Nile Red **16b**, respetivamente, por reação de condensação catalisada por ácido, como mostrado no Esquema 1.



Esquema 1. Síntese dos derivados do Nile Blue **16a** ou Nile Red **16b** através do derivado nitrosado do 3-aminofenol **14** e derivado do naftaleno **15a,b**.

Outra abordagem para a síntese de benzo[*a*]fenoxazinas é a utilização de um intermediário azo. Este método foi usado por Ho e colaboradores²⁰ na preparação de derivados do Nile Blue possuindo grupos sulfonato. A escolha desta abordagem reside no facto de as nitrosoanilinas sulfonadas

apresentarem um desempenho insatisfatório na reação de condensação final que origina a benzo[*a*]fenoxazina. A sulfonação direta da benzo[*a*]fenoxazina não é desejável, uma vez que existem várias posições arilo que são susceptíveis à substituição, dificultando posteriormente o processo de purificação e afetando o rendimento da reação. Esta via de síntese inicia-se com a conversão da *p*-nitroanilina **19** num sal de diazônio **20** que pode reagir com o intermediário derivado do aminofenol **17a,b** ou do naftaleno **18**. Os produtos **21** ou **22** são depois submetidos a reação de condensação com o outro derivado, originando o composto final **23a-c** (Esquema 2).²⁰



Esquema 2. Síntese de derivados do Nile Blue **23a-c** através de um intermediário azo **21** ou **22**.²¹

A síntese de benzo[*a*]fenoxazinas por aquecimento convencional é normalmente muito demorada. Firmino *et al.* otimizaram a reacção de condensação de hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosafenol com 1-amino-6-hidroxinaftaleno sob irradiação de microondas.²² Utilizando etanol como solvente, foi possível obter o produto espectável **24a** com rendimento de 68% em apenas um minuto e com rendimento de 97% em três minutos. Vários análogos do Nile Blue foram então sintetizados em três

minutos ou menos com rendimentos superiores a 75%, revelando que a síntese por microondas pode ser uma alternativa interessante na obtenção destes compostos (Figura 10).

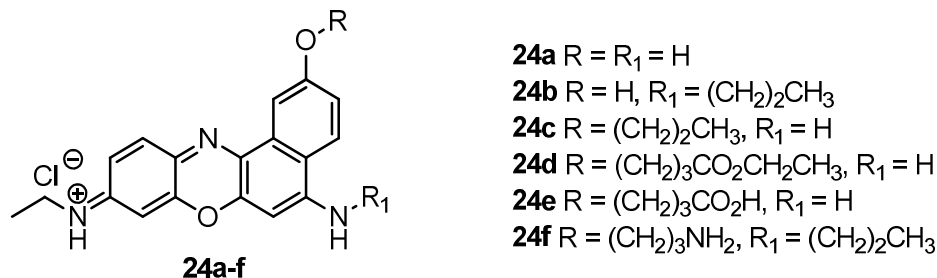


Figura 10. Síntese de derivados do Nile Blue **24a-f** sob irradiação de microondas.²²

A síntese por ultrassons foi também testada para reduzir o tempo de síntese de benzo[*a*]fenoxazinas. Raju *et al.* compararam os tempos e rendimentos de reações de condensação de diferentes derivados através dos métodos convencionais e com irradiação por ultrassons. Os resultados mostram uma diminuição de 3 a 7 vezes do tempo de reação, aumentando nalguns casos os rendimentos (**25b**, Figura 11).²³

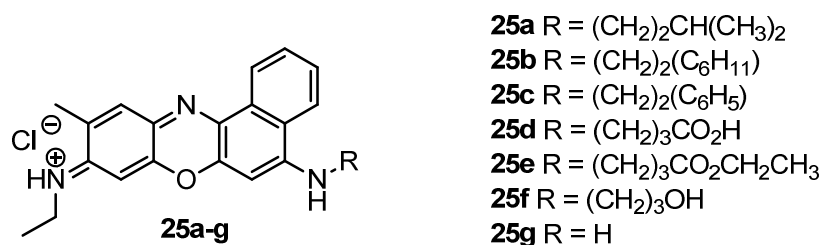


Figura 11. Síntese de derivados do Nile Blue **25a-g** por ultrassons.

A introdução de grupos substituintes no esqueleto do Nile Red e Nile Blue é efetuada normalmente para alterar as suas características, tornando os derivados resultantes mais adequados às aplicações pretendidas. Grupos como cadeias alquílicas, ésteres, ácidos carboxílicos, aminas ou halogéneos têm sido introduzidos nestes compostos, alterando a sua solubilidade ou permitindo a formação de novas ligações a moléculas específicas.

Longas cadeias alquílicas conferem às benzo[*a*]fenoxazinas um ainda maior carácter lipofílico. Naik *et al.* sintetizaram derivados do Nile Blue **26a,b** com cadeias de 20 carbonos como substituintes nas aminas das posições 5 e 9 e testaram a sua capacidade como sondas membranares, concluindo

que as moléculas sintetizadas forneciam informação relevante sobre as estruturas membranares (Figura 12).²⁴

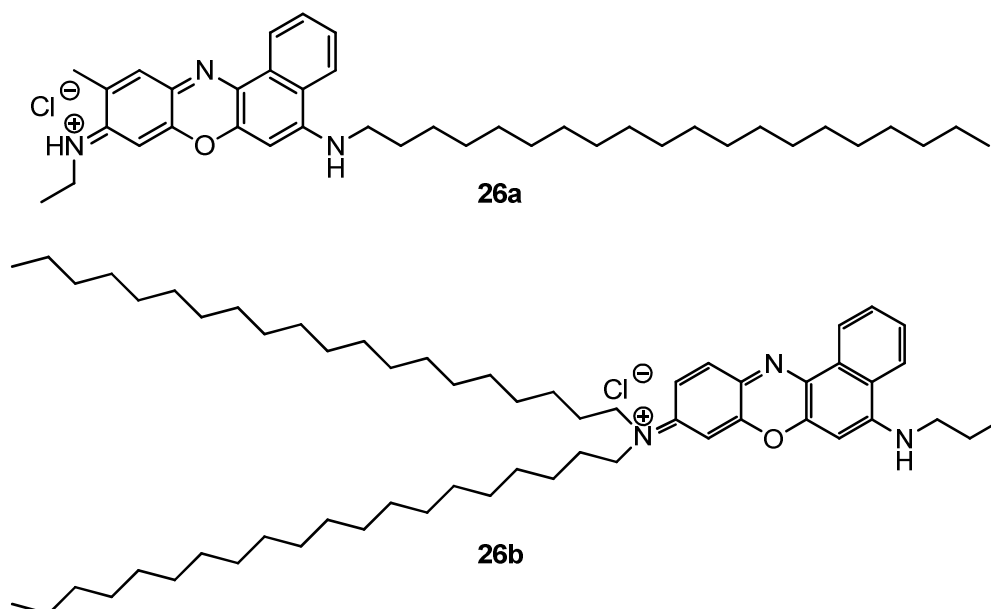


Figura 12. Derivados do Nile Blue **26a,b** com cadeias alquílicas de 20 carbonos.

O grupo funcional ácido carboxílico pode ser introduzido numa benzo[*a*]fenoxazina diretamente ou através de ésteres, que são mais estáveis e podem ser facilmente hidrolisados. Este substituinte torna o derivado de benzo[*a*]fenoxazina adequado para marcação covalente de aminoácidos dado que pode ligar-se a uma amina desprotegida por ligação amida (Figura 13).²⁵

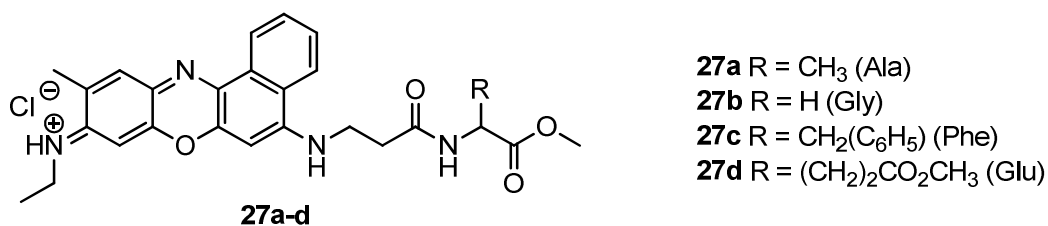


Figura 13. Derivados do Nile Blue **27a-d** ligados a aminoácidos.²⁵

De igual forma, o grupo amina é também um grupo em destaque no *design* de novos derivados, podendo também originar ligações covalentes com aminoácidos.²⁶ Para além disso, este grupo pode ser usado para incorporar outros substituintes menos comuns na molécula. Um exemplo é o trabalho de Wang *et al.* em que a indometacina (IMC) foi ligada ao núcleo de benzo[*a*]fenoxazina através de uma

hexanodiamina presente na posição 5, de modo a funcionar como sonda fluorescente da enzima ciclooxigenase 2 (COX2), sobreexpressa em células tumorais. Este longo espaçador foi usado para permitir a introdução do grupo IMC no local ativo da enzima e esta molécula **28** revelou-se uma possível sonda para imagiologia de tumores (Figura 14).²⁷

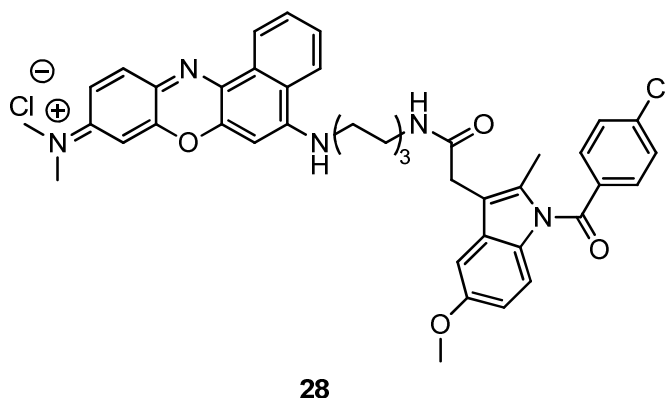


Figura 14. Derivado Nile Blue-IMC **28** possuindo a hexanodiamina como grupo de ligação.

Kanitz e Hartmann prepararam ainda algumas benzo[*a*]fenoxazinas com um núcleo de julolidina nas posições 8, 9 e 10 (composto **29**). Estes compostos podem ser interessantes uma vez que a rotação em torno da amina da posição 9 é reduzida, tornando as estruturas ainda mais planares e, por isso, melhorando as propriedades fotofísicas (Figura 15).²⁸

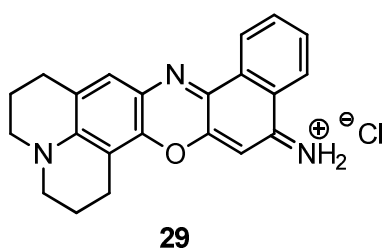


Figura 15. Estrutura de um derivado de benzo[*a*]fenoxazina contendo julolidina **29**.

1.3.3 Propriedades fotofísicas

As benzo[*a*]fenoxazinas caracterizam-se em termos fotofísicos não só pelas suas elevadas intensidades de fluorescência, devido ao núcleo rígido de duplas ligações dos vários anéis aromáticos, reduzindo as vibrações e rotações da molécula, mas também pelos elevados comprimentos de onda de

absorção de radiação e de emissão de fluorescência. Emitindo na zona do NIR, são moléculas especialmente promissoras em imagiologia intracelular.

O Nile Red **10** apresenta um comprimento de onda de absorção máxima aproximadamente de 550 nm em metanol, enquanto para o Nile Blue **11** este valor aproxima-se de 630 nm. Esta variação explica-se pelas diferenças dos sistemas dador-aceitador das duas moléculas. O Nile Red **10** é uma molécula neutra e apresenta um grupo amina como dador e um grupo carbonilo como aceitador de eletrões. Por sua vez, o Nile Blue **11** é uma molécula catiónica com um grupo imínio como forte aceitador, o que induz um dipolo na molécula e torna a transferência de carga intramolecular mais fluída. Esta maior deslocalização de eletrões traduz-se num desvio batocrómico do comprimento de onda de absorção.

A presença de substituintes alquílicos no grupo imínio desta molécula resulta no aumento da densidade eletrónica da ligação N-H, por efeito indutivo, aumentando a força das ligações de hidrogénio subsequentemente formadas, diminuindo a acidez do protão.

O pH do meio é um aspeto relevante a ter em conta nas características do Nile Blue **11** e dos seus derivados. A valores de pH baixos, surge a forma ácida mas, em ambientes básicos, esta pode desprotonar. As espécies de corante desprotonadas apresentam desvios hipsocrómicos de aproximadamente 100 nm no comprimento de onda de absorção máxima e são uma ordem de magnitude menos fluorescentes que as formas ácidas (Figura 16).

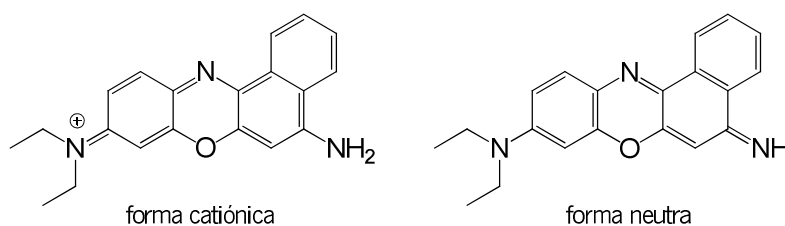


Figura 16. Estruturas da forma catiónica (ácida) e neutra (básica) do Nile Blue **11**.

As propriedades fotofísicas destas moléculas variam significativamente com o solvente utilizado. Solventes com grande capacidade aceitadora de protões apresentam normalmente apenas a forma básica da molécula, desprotonada. Quando a capacidade aceitadora de protões do solvente desce, aumenta a capacidade de doar os mesmos, o que faz com que a forma ácida se torne predominante. É de realçar que os substituintes presentes no núcleo de benzo[a]fenoxazina podem causar alterações nas propriedades fotofísicas das moléculas nos diferentes solventes.²⁹

Em água, o comportamento fotofísico do Nile Blue **11** é determinado pela forma ácida do corante, que pode originar agregados H que não fluorescem. Verificou-se que pequenas alterações nos substituintes da molécula de corante originavam efeitos mensuráveis no equilíbrio ácido/base relativamente à capacidade das moléculas de solvente atuarem como aceitadores de ligações de hidrogénio.

Golini *et al.* avaliaram ainda as capacidades termocrómicas do Nile Red **10**. Os resultados mostraram um pequeno desvio hipsocrómico do comprimento de onda de fluorescência máxima, de apenas 6 nm com um aumento de 50 K na temperatura, revelando assim reduzido termocromismo.³⁰

1.3.4 Aplicações

Como já referido, as benzo[*a*]fenoxazinas apresentam diversas aplicações nas mais variadas áreas. O Nile Red **10**, o Nile Blue **11** e seus derivados já foram aplicados em várias áreas da ciência dos materiais^{31–34} ou em nanopartículas.^{35,36} Um exemplo interessante deste último caso é a aplicação do Nile Red **10** em nanopartículas de ouro para deteção de grupos tiol. A benzo[*a*]fenoxazina adsorvida à superfície das partículas não apresenta fluorescência devido ao fenómeno de FRET com as próprias nanopartículas, que emitem também fluorescência. Numa solução com tiois, estes competem pelos locais de ligação, aumentando a fluorescência do Nile Red **10**, sendo este método seletivo para tiois relativamente a outros grupos como álcoois ou aminas.^{37–40}

As propriedades do Nile Red **10** e Nile Blue **11** foram também aproveitadas no *design* de sensores de vários iões como potássio,³¹ mercúrio⁴¹ e hipoclorito,⁴² ou mesmo de pH.^{43,44} No entanto, as aplicações biológicas de ambos são uma das áreas de maior interesse. Devido às suas características fotofísicas, os derivados de benzo[*a*]fenoxazina são bastante usados como sondas fluorescentes.

O Nile Red **10** acumula-se preferencialmente em gotas lipídicas e é usado amplamente em estudos de imagiologia neste âmbito.^{45,46} No entanto, este composto foi também usado noutros estudos como da ligação de um polímero a uma bactéria,⁴⁷ de deteção de diferenças entre membranas celulares normais e danificadas⁴⁸ ou da localização de proteínas membranares.⁴⁹ Escoffre *et al.* usaram também este composto para testar a estabilidade de um anticorpo comercial em condições de hipotermia induzida em células tumorais.⁵⁰

Devido à sua maior solubilidade em água, o Nile Blue **11** apresenta ainda um maior interesse biológico. Diversos casos de sondas baseadas no Nile Blue **11** já foram relatados, sendo que podem marcar péptidos, DNA ou mesmo células tumorais. Kuramitz *et al.* estudaram a interação entre a avidina,

uma proteína presente na clara dos ovos, e a biotina, conhecida como vitamina B7, através da ligação do Nile Blue **11** ao ligando.⁵¹ Mie *et al.* estudaram as propriedades eletroquímicas do DNA através da marcação com esta molécula.⁵² A ligação de péptidos ao DNA também pode ser avaliada pela intercalação de Nile Blue **11** no DNA.⁵³

A imagiologia de tumores é uma área em destaque nos últimos anos. O Nile Blue **11** é usado como sonda para marcação destes tecidos. Exemplos destes casos são o já referido estudo de Wang *et al.*²⁷ em que a marcação é efetuada pela marcação de um ligando da COX2, a sonda criada por Guo e colaboradores para a deteção da enzima Pim-1 cinase, que também é sobreexpressa em células cancerígenas, ou o estudo de Nagy-Simon e colaboradores, que criaram nanoesferas de ouro com anticorpos antiCD19 e com Nile Blue **11** de modo a marcar linfoblastos CD19 de células cancerígenas.

Nos últimos anos têm sido cada vez mais estudadas as benzo[*a*]fenoxazinas não só como sondas fluorescentes, mas também como agentes antiproliferativos. Atividades antimicrobianas,⁵⁴ antitumorais,^{55,56} antifúngicas^{26,57,58} e anti-inflamatórias⁵⁹ de compostos deste tipo ou semelhantes foram descritas o que torna as benzo[*a*]fenoxazinas um alvo de estudo com grande potencial na área da Biologia. Estas moléculas ou derivados também são usados em terapia fotodinâmica (PDT).^{60–63}

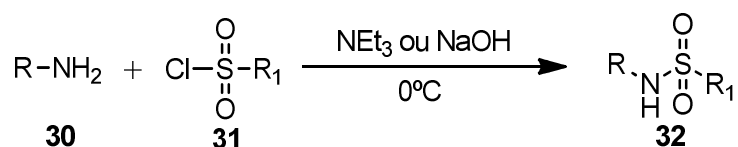
Alguns destes compostos exibem atividade antiproliferativa por intercalarem com o DNA, devido à sua estrutura aromática planar que permite a intercalação entre os pares de bases de DNA, formando pontes de hidrogénio e ligações π - π que destroem as funções do DNA, levando à morte celular.⁶⁴ A capacidade antiproliferativa de um composto pode ser expressa através dos valores de MIC (*minimum inhibitory concentration*). Estes valores são obtidos através de testes simples descritos por normas internacionais e representam a concentração mínima de composto que inibe em mais de 80% o crescimento celular, podendo avaliar, por exemplo, as capacidades antifúngicas ou antibacterianas de um composto, tendo em conta o organismo modelo usado.

A informação disponível relativa ao potencial das benzofenoxazinas como agentes antiproliferativos ainda é limitada e, assim, continua a ser necessária a investigação ao nível da síntese de novos derivados e da avaliação das suas atividades biológicas e a utilização dessa informação no design de moléculas com propriedades otimizadas. Nos últimos anos, o grupo de investigação no qual se inseriu o presente trabalho tem vindo a sintetizar novos derivados de benzo[*a*]fenoxazina, avaliando as suas propriedades fotofísicas e potencial aplicação como agentes antiproliferativos e como sondas para marcação de material biológico.^{24,29,65–68} Assim, na continuação deste trabalho e no âmbito da presente dissertação pretendeu-se estudar novos derivados de benzo[*a*]fenoxazina com diferentes substituintes, designadamente grupos sulfonamida, atendendo ao interesse a nível biológico dos compostos deste tipo.

1.4 Sulfonamidas

1.4.1 Síntese

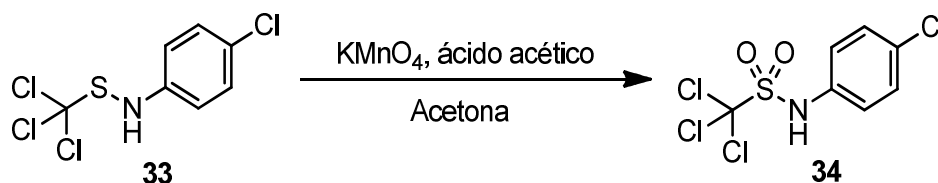
As sulfonamidas são uma família de compostos conhecida pela sua utilização como agentes antimicrobianos. A síntese das sulfonamidas **32** é normalmente efetuada através da reação entre um cloreto de sulfonilo **31** e uma amina **30**, requerendo uma base como hidróxido de sódio ou trietilamina (Esquema 3).



Esquema 3. Síntese de sulfonamidas **32** partindo de um cloreto de sulfonilo **31** e uma amina **30**.

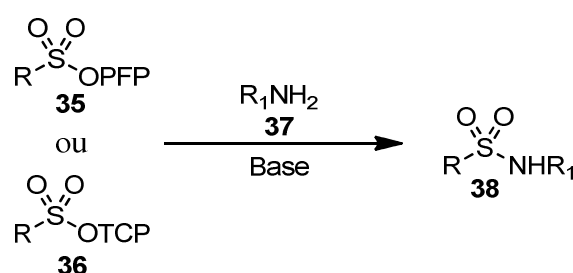
Uma das primeiras descrições de síntese foi efetuada por Koburger em 1903, usando um cloreto de sulfonilo simples e uma amina primária. Desde aí várias sulfonamidas foram sintetizadas por este método, com os mais variados substituintes. Por vezes, é difícil obter o cloreto de sulfonilo com o substituinte pretendido. Foram reportadas sínteses de sulfonamidas usando como precursores dos cloretos de sulfonilo tióis,^{69,70} tioanisóis,⁷¹ sulfonatos de sódio⁷² e ácidos sulfônicos.⁷³ Lai *et al.* funcionalizaram núcleos de quinolina, usando ácido clorossulfúrico para a obtenção dos cloretos de sulfonilo adequados para a síntese das sulfonamidas.⁷⁴ Gennari *et al.* sintetizaram ainda peptidomiméticos, substituindo a ligação amida por uma ligação sulfonamida, devido às suas semelhanças estruturais, apresentando várias vantagens face aos péptidos normais tais como uma maior resistência ao catabolismo metabólico e possibilidade de formação de pontes de hidrogénio mais fortes.⁷⁵

Outra forma de obter sulfonamidas é através da forma reduzida das mesmas, as sulfenamidas. Farrar *et al.* testaram condições oxidantes numa sulfenamida **33**, usando permanganato de potássio, obtendo a sulfonamida correspondente (**34**, Esquema 4).⁷⁶ No entanto, Glass *et al.* verificaram que o ácido *meta*-cloroperoxibenzóico era um agente oxidante mais efetivo e obtiveram sulfonamidas com melhores rendimentos.⁷⁷ Tasaka *et al.* tentaram sintetizar sulfonamidas contendo um núcleo de triazole através do correspondente cloreto de sulfonilo.⁷⁸ No entanto, o produto esperado não foi obtido e foi então utilizada uma sulfenamida para a síntese, utilizando tanto permanganato de potássio ($\eta = 59\%$) como ácido *meta*-cloroperoxibenzóico ($\eta = 71\%$), consolidando assim as conclusões de Glass e colaboradores.



Esquema 4. Síntese de sulfonamidas **34** através de sulfenamidas **33**.

Os ésteres de sulfonato são outra classe de compostos recentemente abordados na síntese de sulfonamidas. Caddick *et al.* introduziram os ésteres de pentafluorofenil (PFP) sulfonato **35** que, devido à sua estrutura, tornam o átomo de enxofre mais suscetível a um ataque nucleofílico.⁷⁹ Estes compostos apresentam a vantagem de serem muito estáveis ao contrário de alguns cloretos de sulfonilo. No entanto, devido à possível toxicidade do composto e ao custo relativamente elevado do PFP, o mesmo grupo de investigação sugeriu os ésteres de triclorofenil (TCP) sulfonato **36** como alternativa mais favorável, apesar de resultarem em rendimentos de sulfonamida inferiores face aos ésteres de PFP (Esquema 5).⁸⁰



Esquema 5. Síntese de sulfonamidas **38** através de ésteres de sulfonato **35** e **36**.

Os vários métodos de síntese de sulfonamidas, incluindo métodos específicos como, por exemplo, os que envolvem catálise com metais de transição como cobre⁸¹⁻⁸³ ou paládio^{84,85} estão compilados no trabalho de Ashfaq *et al.*⁸⁶

Com vários derivados de sulfonamidas já descritos ao longo do tempo, é possível perceber os efeitos das alterações estruturais na atividade biológica dos mesmos. Alsughayer *et al.* concluíram que substituintes heterocíclicos aumentam a atividade antibacteriana dos compostos⁸⁷ enquanto Ozbek *et al.* mostraram que cadeias alquílicas longas como substituintes diminuem a atividade biológica.⁸⁸

1.4.2 Aplicações

Uma das primeiras sulfonamidas descritas foi o Prontosil **39**, um corante descoberto por Domagk em 1935, ativo contra infecções bacterianas (Figura 17).⁸⁹ Este composto é metabolizado no organismo formando o metabolito ativo, a sulfanilamida **40**, o que levou a que vários análogos deste composto fossem desenvolvidos como agentes antibacterianos. Durante algum tempo, até à introdução da penicilina, as sulfonamidas foram a principal forma de combate a infecções bacterianas. Entretanto, foram progressivamente substituídas por outros compostos, embora ainda sejam usadas em certos tipos de infecções. Foram descritas aplicações de sulfonamidas como agentes anti-malária,⁹⁰ antioxidantes,⁹¹ anti-inflamatórios,⁹² anti-diabéticos⁹³ e até no tratamento da doença de Alzheimer.⁹⁴

O mecanismo de ação destas moléculas enquanto agentes antibacterianos prende-se com o metabolismo do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) **41**. O PABA **41** é um substrato presente na síntese do ácido fólico, também conhecido como vitamina B9, e as sulfonamidas atuam como inibidores competitivos nesta síntese. O ácido fólico está envolvido na síntese de bases azotadas e, sendo inibido, as bactérias não conseguem obter timidina e uridina. Assim, não produzindo novo DNA, a reprodução celular das bactérias não ocorre. Na Figura 17 é possível observar as semelhanças estruturais entre o PABA **41** e a sulfanilamida **40**.

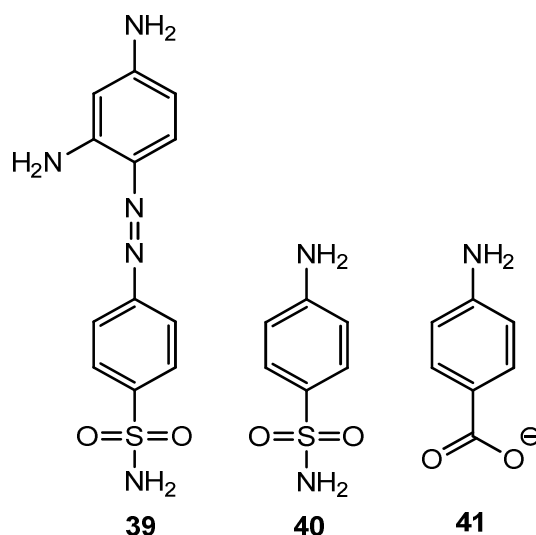


Figura 17. Estrutura do Prontosil **39**, sulfanilamida **40** e PABA **41**.

As sulfonamidas possuem ainda potencialidades a nível de atividade antitumoral e antiviral.⁹⁵ A capacidade antitumoral das sulfonamidas prende-se principalmente com a inibição da enzima anidrase

carbônica (CA). Esta enzima catalisa a hidratação do dióxido de carbono e a reação reversa, sendo responsável pelo equilíbrio entre este e o bicarbonato no organismo, formando o bicarbonato necessário em várias vias metabólicas e controlando a libertação de dióxido de carbono dos tecidos para o sangue e do sangue para os pulmões. As sulfonamidas inibem esta enzima e, por essa razão, são usadas várias sulfonamidas no tratamento de doenças relacionadas como, por exemplo, a acetazolamida **42** e a diclorofenamida **43**, representadas na Figura 18.

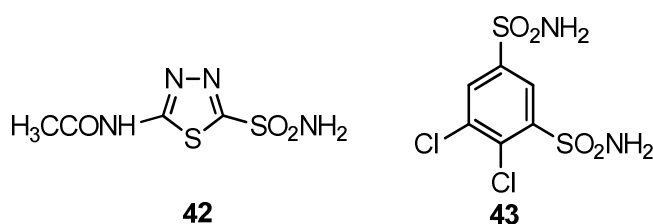


Figura 18. Estruturas da acetazolamida **42** e diclorofenamida **43**.

Existem catorze tipos diferentes de anidrases carbônicas no corpo humano, sendo que a CA IX e a CA XII são sobreexpressas em células tumorais, o que revela que inibidores destes dois tipos de enzima podem ser bons agentes anticancerígenos. Assim, Vullo *et al.* estudaram a inibição da CA IX por parte de várias sulfonamidas, observando uma inibição da enzima para concentrações na ordem dos 14-285 nM.⁹⁶ No entanto, a maior parte dos compostos não apresentava seletividade para a CA IX, inibindo também outras isoformas da CA.

A atividade anticancerígena das sulfonamidas não é, no entanto, exclusivamente relacionada com as enzimas CA. A cloroquinoxalina **44** é uma sulfonamida que exibe atividade antitumoral e chegou até aos ensaios clínicos de fase II (Figura 19).⁹⁷ O seu mecanismo de ação não foi ainda explicado, mas não está relacionado com as anidrases nem com o metabolismo do ácido fólico.

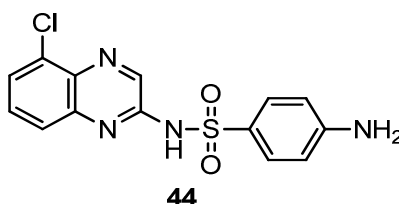


Figura 19. Estrutura da cloroquinoxalina **44**.

A sulfonamida E7010 foi sintetizada por Yoshino *et al.*⁹⁸ e apresenta uma boa atividade antitumoral, sendo que outras duas sulfonamidas baseadas no núcleo da E7010, a ER-34410 e a E7070 **45**,⁹⁹ apresentam uma maior atividade anticancerígena, estando esta última em ensaios clínicos avançados (Figura 20).¹⁰⁰ Estes compostos impedem a multiplicação das células tumorais inibindo a mitose através da inibição da polimerização das tubulinas.¹⁰¹

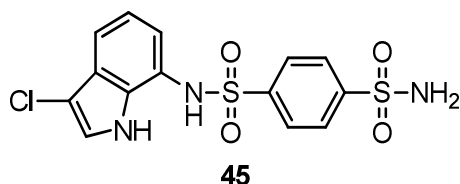


Figura 20. Estrutura da sulfonamida E7070 **45**, em ensaios clínicos avançados.

As sulfonamidas têm vindo a ser investigadas também como inibidores de proteases. O genoma do HIV codifica três enzimas, incluindo a HIV protease, sendo que vários derivados de sulfonamida têm capacidade inibitória face a esta enzima. Inibidores desta enzima em conjunto com inibidores da enzima transcriptase reversa, outra das enzimas codificadas pelo HIV, podem ser usados no tratamento da SIDA. Várias sulfonamidas, como o amprenavir **46**¹⁰² e o tipranavir **47**,¹⁰³ são já usadas no tratamento desta doença (Figura 21).

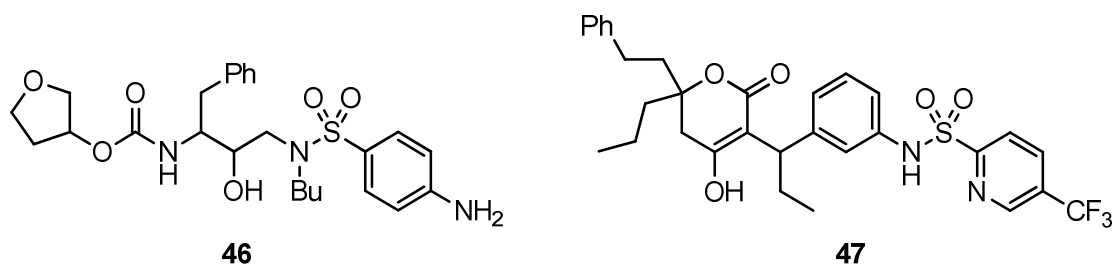


Figura 21. Estruturas do amprenavir **46** e do tipranavir **47**.

Outras formas de tratar o HIV relacionam-se com a inibição da transcriptase reversa do vírus, da HIV integrase ou com a própria entrada do vírus nas células. Alguns dos novos compostos usados nestas formas de tratamento são também sulfonamidas, o que impulsiona estes compostos para um papel interessante no que diz respeito ao *design* de novos compostos capazes de inibir o HIV.

1.5 Plano e objetivos

Atendendo ao suprarreferido interesse das benzo[*a*]fenoxazinas e das sulfonamidas, o objetivo deste trabalho foi sintetizar benzo[*a*]fenoxazinas com o grupo sulfonamida como substituinte, avaliando as suas propriedades fotofísicas e antifúngicas. Para uma melhor percepção do efeito do grupo, foram sintetizadas mais cinco benzo[*a*]fenoxazinas sem o grupo sulfonamida para comparação de resultados.

O método utilizado para a síntese das benzo[*a*]fenoxazinas com diferentes combinações de substituintes nas aminas das posições 5 e 9 do sistema policíclico foi a condensação de um derivado nitrosado do aminofenol com a naftalen-1-amina ou um derivado apropriado. O grupo sulfonamida foi introduzido na posição 5 do sistema policíclico através da preparação prévia do derivado hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina e da reação deste com o cloreto de sulfonilo correspondente, na presença de trietilamina.

Relativamente à substituição da amina da posição 9, estudos anteriores do grupo de investigação provaram que o tamanho do substituinte alquílico que mais favorece a atividade biológica destes compostos é de três carbonos. A presença de um grupo metilo na posição 10 da molécula em conjunto com um grupo etilo na amina da posição 9 mostrou também ser relevante. Assim, os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio sintetizados apresentam uma ou duas cadeias de três carbonos na amina da posição 9, ou um grupo etilo nesta posição em conjunto com um grupo metilo na posição 10.

Foram efetuados testes fotofísicos em etanol e a vários valores de pH para avaliar não só as propriedades fotofísicas gerais dos compostos, mas também as potenciais variações que podem ocorrer em diferentes organelos celulares.

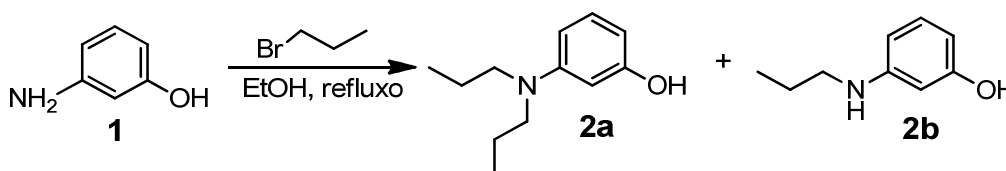
Foram ainda efetuados testes de atividade antifúngica de forma a perceber se a introdução do grupo sulfonamida melhora a atividade das benzo[*a*]fenoxazinas, tendo-se obtido o valor de MIC para cada composto.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Síntese dos derivados *N*-substituídos do 3-aminofenol **2a,b**

O primeiro passo na síntese dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio foi a *N*-alquilação do 3-aminofenol, obtendo-se os derivados **2a** e **2b**, com os substituintes pretendidos para a posição 9 do sistema policíclico aromático dos compostos finais.

Os derivados di- e mono-alquilados, **2a** e **2b**, foram obtidos através da reação do 3-aminofenol com 1-bromopropano, em etanol e sob refluxo, como representado no Esquema 6. A reação foi monitorizada por TLC, a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna e os compostos foram obtidos na forma de óleos castanhos com rendimentos de 24 e 57%, respetivamente.



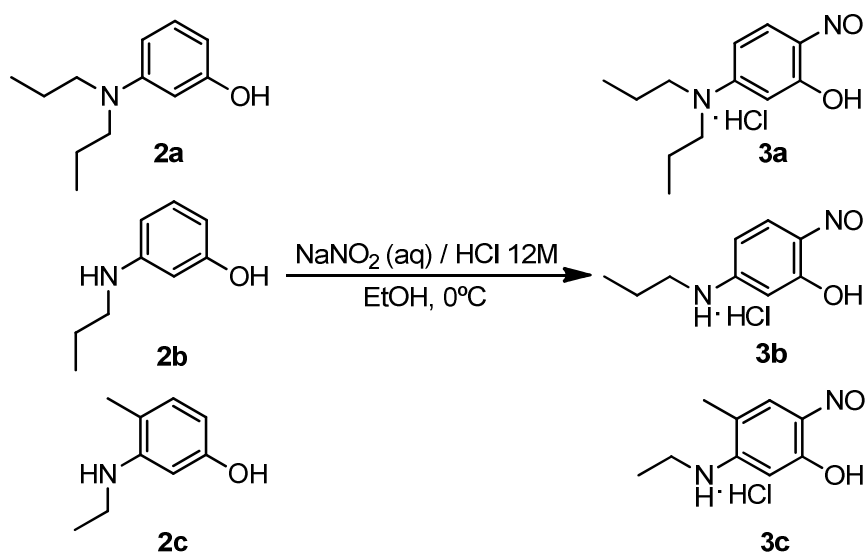
Esquema 6. Síntese dos derivados *N*-substituídos do 3-aminofenol **2a,b**.

A estrutura dos compostos foi confirmada por RMN de ^1H .⁵⁸ Nos espetros correspondentes, para além dos sinais aromáticos característicos do 3-aminofenol que foram identificados na zona esperada (δ 6,17-7,07 ppm), surgiram os sinais alifáticos dos grupos propilo, designadamente os sinais dos prótons metilo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ na forma de tripletos (δ 0,94-0,97 ppm), os prótons metilénicos $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ também na forma de tripletos (δ 3,03-3,22 ppm) e os sinais do grupo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ na forma de sextetos (δ 1,62 ppm). A diferença entre os derivados di- e mono-alquilados revelou-se pela integração dos sinais alifáticos e pela presença do próton do NH na forma de um singlete alargado a 4,91 ppm no caso do composto **2b**.

2.2 Síntese dos derivados nitrosados **3a-c**

Os derivados **2a** e **2b** e o reagente comercial **2c** em solução de etanol, a baixa temperatura, foram nitrosados usando nitrito de sódio em solução aquosa, na presença de ácido clorídrico, obtendo-se os derivados correspondentes, designadamente hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a**, hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosofenol **3b** e hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosofenol **3c**.

As reações foram seguidas por TLC e os compostos obtidos na forma de sólidos oleosos laranja foram usados nas reações seguintes sem qualquer purificação.

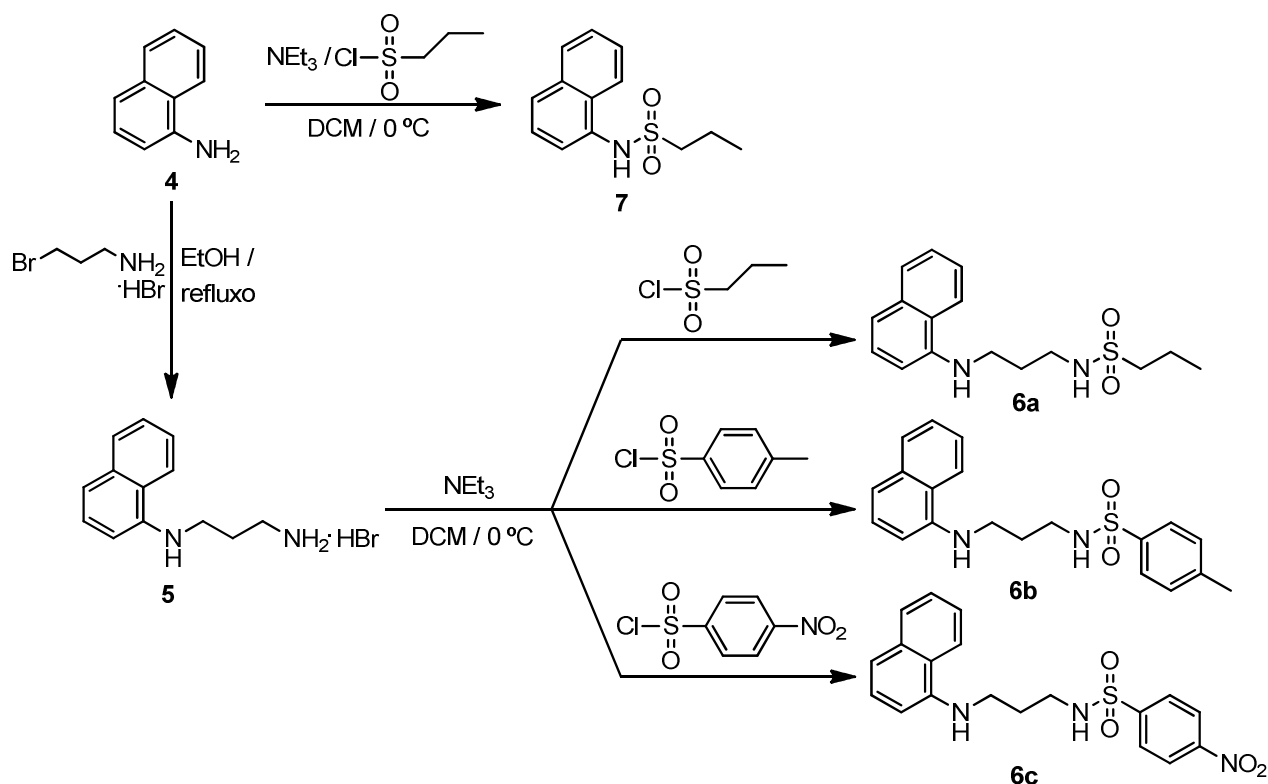


Esquema 7. Síntese dos derivados nitrosados **3a-c**.

2.3 Síntese dos derivados *N*-substituídos da naftalen-1-amina **5**, **6a-c** e **7**

A naftalen-1-amina **4** foi o precursor escolhido para incorporar as ligações sulfonamida, de modo a ficarem na posição 5 do esqueleto da benzo[*a*]fenoxazina. O derivado hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** resultou da *N*-alquilação da naftalen-1-amina com hidrobrometo de 3-bromopropan-1-amina, em etanol e sob refluxo. A reação foi seguida por TLC, o resíduo purificado por cromatografia em coluna, originando o composto **5** na forma de um sólido violeta com um rendimento de 17%. Este valor pode ser explicado pela semelhança de polaridades do reagente alquilante de partida e do produto final, impossibilitando o isolamento da totalidade do composto **5** formado na forma pura.

O espectro de RMN de ^1H mostra os sinais aromáticos característicos da naftalen-1-amina que se mantêm no derivado **5** (δ 6,55-8,13 ppm) e os sinais alifáticos dos grupos metilênicos da propilamina introduzida, designadamente $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$ sob a forma de um quinteto (δ 1,95 ppm), $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$ como um multipeto (δ 2,90-2,99 ppm) e $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$ como um tripleto (δ 3,30 ppm).



Esquema 8. Síntese dos derivados *N*-substituídos da naftalen-1-amina **5**, **6a-c** e **7**.

O composto **5**, em diclorometano, a baixa temperatura, na presença de trietilamina, reagiu com cloreto de propano-1-sulfonilo, cloreto de 4-metilbenzeno-1-sulfonilo e cloreto de 4-nitrobenzeno-1-sulfonilo, originando os derivados *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a**, 4-metil-*N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)benzenossulfonamida **6b** e *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)-4-nitrobenzenossulfonamida **6c**, respectivamente. O derivado **6a** foi isolado por cromatografia em coluna e obtido na forma de um óleo preto com um rendimento de 61%. No caso dos derivados **6b** e **6c**, a purificação das misturas reacionais correspondentes pela mesma técnica originou óleos castanhos escuros, cujos espectros de RMN de ¹H mostram que o derivado **6b** não estava completamente puro e o derivado **6c** apresentava mistura com outros compostos, tendo sido usados nestas formas nas reações seguintes.

Os espectros de RMN de ¹H dos derivados **6a-c** mostram os sinais aromáticos (δ 6,37-8,07 ppm) e alifáticos (δ 1,75-3,46 ppm) comuns ao reagente de partida **5**. Para além desses sinais, o espectro do derivado **6a** mostra os sinais do substituinte propilo ligados ao grupo sulfonilo, designadamente os prótons metílicos na forma de um tripleto (δ 1,03 ppm) e metilénicos dos grupos $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (δ 1,77-1,87 ppm) e $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (δ 2,94-3,04 ppm) sob a forma de multipletos. O espectro do

derivado **6b** revela o sinal do grupo metilo da posição 4 do anel aromático ligado ao grupo sulfonilo na forma de um singleto (δ 2,34 ppm), bem como os sinais dos prótons aromáticos desse anel presentes nas posições 3 e 5 (*orto*-CH₃) na forma de um multipletto (δ 7,30-7,43 ppm) e nas posições 2 e 6 (*meta*-CH₃) como um dupletto (δ 7,65 ppm). O espectro do derivado **6c** não permite identificar claramente os sinais aromáticos do substituinte ligado ao grupo sulfonilo, sendo que na benzo[*a*]fenoxazina resultante estes sinais são facilmente identificados.

Do espectro de RMN de ¹³C, obtido apenas para o composto **6a** por questões de pureza, destacam-se os sinais do substituinte propilo ligado ao grupo sulfonilo, designadamente do grupo metílico (δ 12,88 ppm) e dos grupos metilénicos NHSO₂CH₂CH₂CH₃ (δ 17,36 ppm) e NHSO₂CH₂CH₂CH₃ (δ 54,39 ppm).

Foi ainda sintetizado o composto *N*-(Naftalen-1-il)propano-1-sulfonamida **7**, por reação da naftalen-1-amina com cloreto de propano-1-sulfonilo, nas condições anteriormente referidas. Este derivado foi obtido com o objetivo de ser testada a síntese de uma benzo[*a*]fenoxazina possuindo o grupo sulfonamida diretamente ligado à posição 5 do sistema policíclico. Após cromatografia em coluna, o composto **7** foi obtido com um rendimento de 96%.

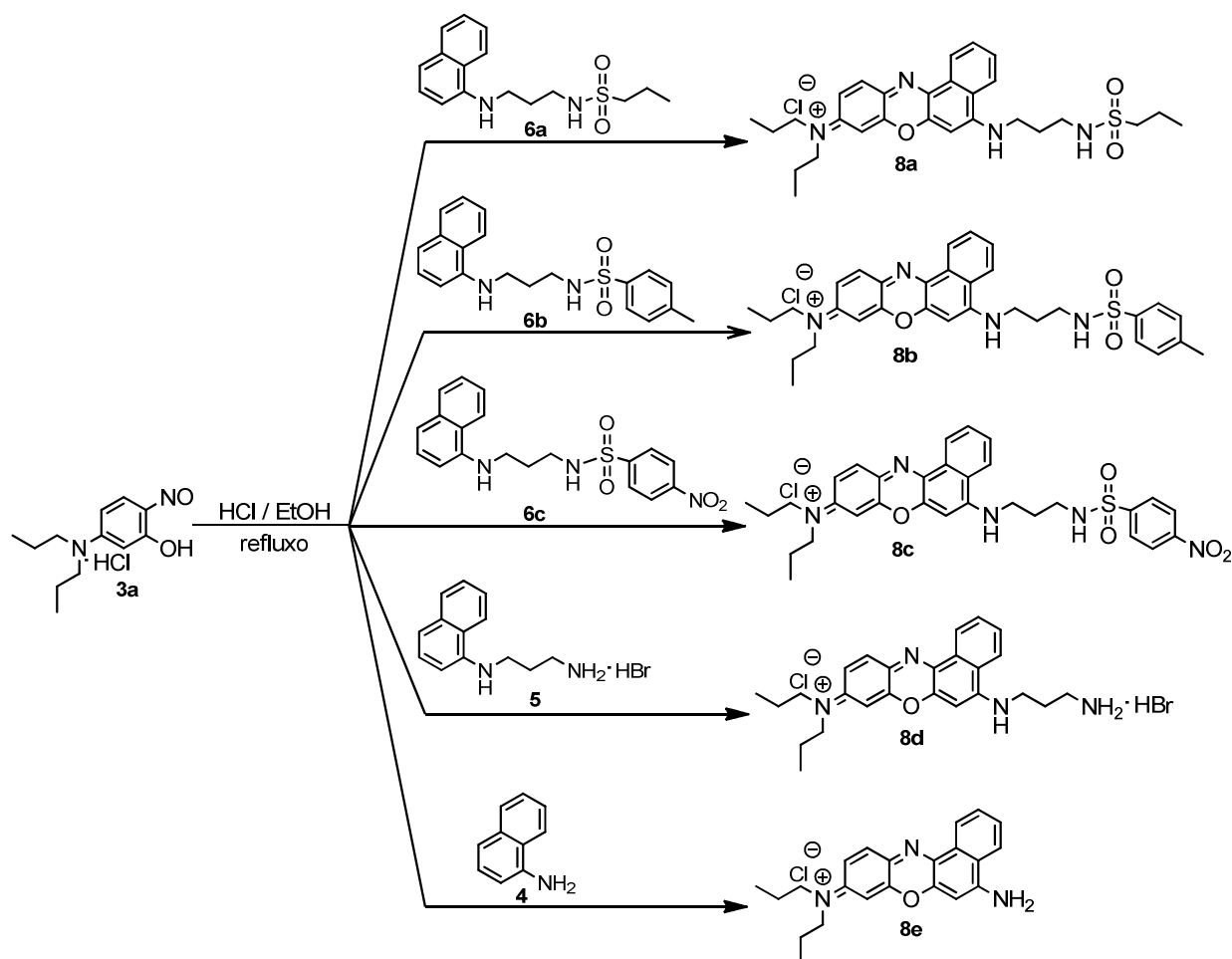
O espectro de RMN de ¹H do derivado **7** mostra, para além dos sinais aromáticos característicos do núcleo de naftalen-1-amina, os sinais alifáticos do grupo propilo introduzido, designadamente os prótons metílicos na forma de um triplete (δ 1,10 ppm) e metilénicos dos grupos NHSO₂CH₂CH₂CH₃ (δ 1,94-2,05 ppm) e NHSO₂CH₂CH₂CH₃ (δ 3,55-3,63 ppm) sob a forma de multipletos.

Em relação ao espectro de RMN de ¹³C, destacam-se os sinais alifáticos correspondentes ao grupo propilo, designadamente os carbonos metílicos (δ 12,92 ppm) e metilénicos (δ 16,93 ppm, NHSO₂CH₂CH₂CH₃ e 57,55 ppm, NHSO₂CH₂CH₂CH₃).

2.4 Síntese dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a-d**

A partir dos derivados nitrosados do 3-aminofenol **3a-c** e da naftalen-1-amina **4** e derivados **5** e **6a-c**, foram sintetizados doze sais de benzo[*a*]fenoxazínio, entre os quais seis com sulfonamidas. O derivado hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a**, condensado com a naftalen-1-amina **4** e derivados **5** e **6a-c**, deu origem a cinco sais de benzo[*a*]fenoxazínio (**8a-e**). As três sulfonamidas, cloreto de *N*-propil-*N*-(5-((3-(propilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-aminio **8a**, cloreto de *N*-(5-((3-(4-metilfenilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-aminio **8b** e cloreto de *N*-(5-((3-(4-nitrofenilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-aminio **8c**, resultaram da condensação do derivado **3a**,

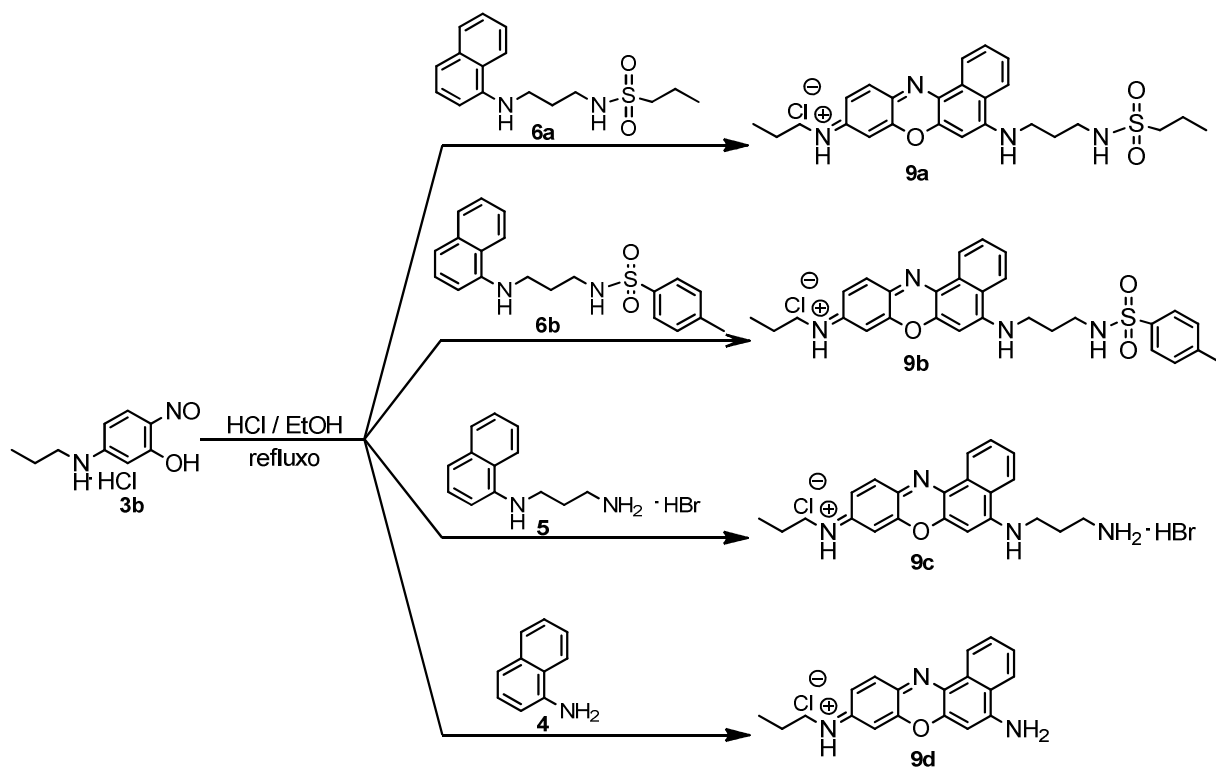
em etanol e sob refluxo, na presença de ácido clorídrico concentrado, com os intermediários *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a**, 4-metil-*N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)benzenossulfonamida **6b** e *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)-4-nitrobenzenossulfonamida **6c**, respetivamente. Foram ainda sintetizados outros dois sais de benzo[*a*]fenoxazínio, designadamente hidrobrometo de cloreto de *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-aminio **8d** e cloreto de *N*-(5-amino-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-aminio **8e**, pela condensação, nas mesmas condições, do nitrosofenol **3a** com hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** e naftalen-1-amina **4** (Esquema 9).



Esquema 9. Síntese dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**.

A purificação por cromatografia em coluna dos resíduos obtidos originou os cinco sais de benzo[*a*]fenoxazínio na forma de sólidos azuis com rendimentos de baixos a moderados (18 a 46%) que foram caracterizados por espectroscopia de IV e RMN (^1H e ^{13}C).

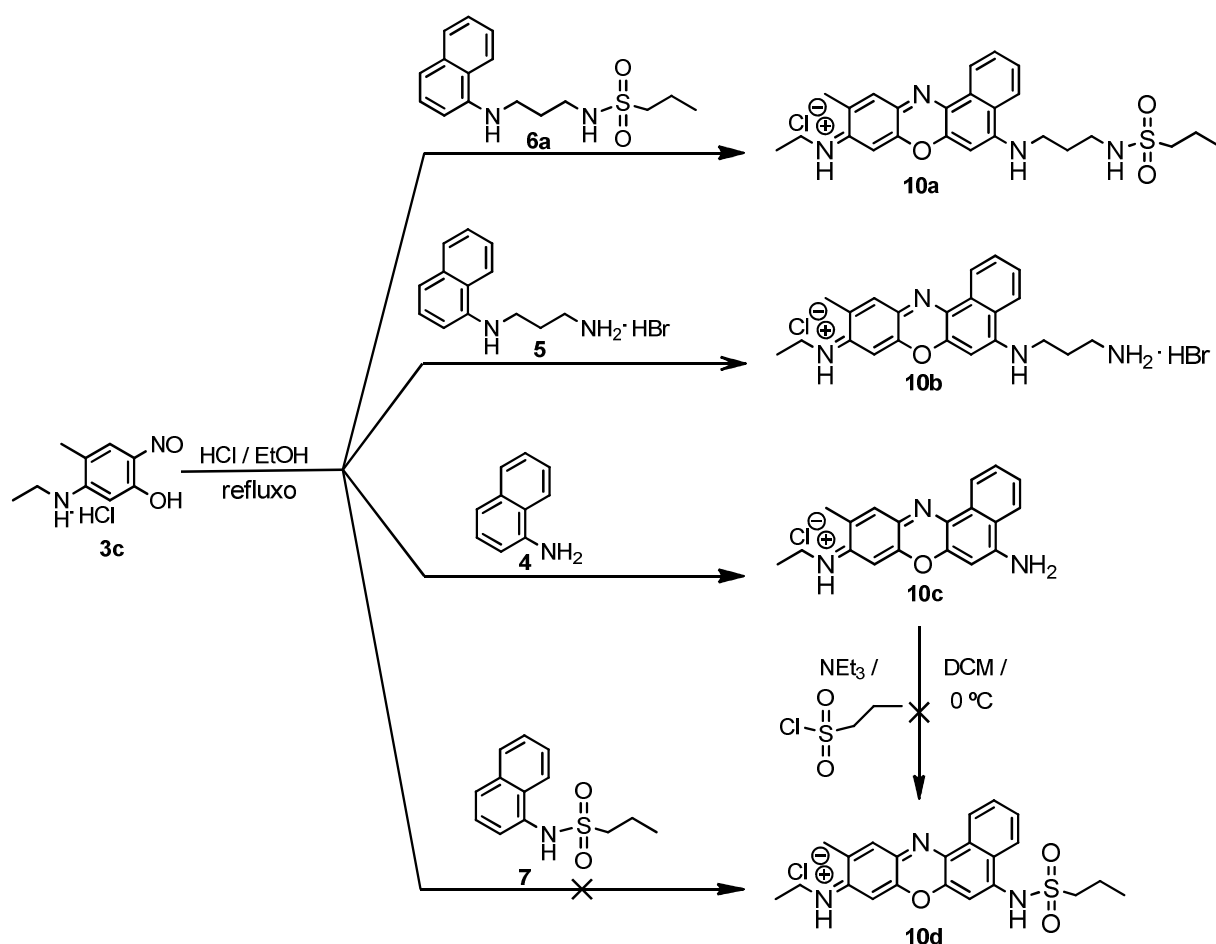
De igual forma, o hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosofenol **3b** foi condensado com a naftalen-1-amina **4** e derivados **5** e **6a-b**, dando origem a outros quatro sais de benzo[*a*]fenoxazínio. Assim, foram obtidos o cloreto de *N*-(5-((3-(propilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-aminio **9a**, cloreto de *N*-(5-((3-(4-metilfenilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-aminio **9b**, hidrobrometo de cloreto de *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-aminio **9c** e cloreto de *N*-(5-amino-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-aminio **9d**, por reação de **3b** com os derivados *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a**, 4-metil-*N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)benzenossulfonamida **6b**, hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** e naftalen-1-amina **4**, respetivamente, em etanol e sob refluxo, na presença de ácido clorídrico concentrado (Esquema 10).



Esquema 10. Síntese dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **9a-d**.

A purificação por cromatografia em coluna dos resíduos obtidos originou os quatro sais de benzo[*a*]fenoxazínio na forma de sólidos azuis com rendimentos de baixos a moderados (19 a 49%), que foram caracterizados por espectroscopia de IV e RMN (^1H e ^{13}C).

Foram ainda sintetizados outros três sais de benzo[*a*]fenoxazínio **10a-c**, partindo de hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosofenol **3c** e dos derivados da naftalen-1-amina *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a**, hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** e da própria naftalen-1-amina **4**. Assim, os compostos finais, cloreto de *N*-(10-metil-5-((3-(propilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio **10a**, hidrobrometo de cloreto de *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-10-metil-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio **10b** e cloreto de *N*-(5-amino-10-metil-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio **10c** foram sintetizados nas condições anteriormente referidas, purificados por cromatografia em coluna e obtidos na forma de sólidos azuis com rendimentos entre 44 e 57% (Esquema 11).



Esquema 11. Síntese e tentativas de síntese dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **10a-d**.

Foi ainda testada a síntese de um sal de benzo[*a*]fenoxazínio com o grupo sulfonamida diretamente ligado à posição 5 do sistema policíclico. Nesse sentido, efetuou-se a reação do nitrosofenol

3c com o derivado *N*-(naftalen-1-il)propano-1-sulfonamida **7**, nas mesmas condições das condensações suprarreferidas, e também a reação do composto **10c** com cloreto de propano-1-sulfonilo, na presença de trietilamina, tal como descrito na preparação dos derivados **6a-c** e **7**. No entanto, em ambos os casos, o composto não foi obtido com sucesso, tal como confirmado por TLC e RMN de ^1H .

Os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a-b** foram caracterizados por espectroscopia de IV e RMN (^1H e ^{13}C). O composto **10c** foi apenas caracterizado por RMN de ^1H .

Nos espectros de IV destacam-se as bandas dos grupos amina ($3437\text{-}3189\text{ cm}^{-1}$) e da ligação C-N ($1642\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$) presente no anel central de oxazina. As bandas correspondentes à ligação S=O surgem entre $1383\text{-}1385$ e $1159\text{-}1187\text{ cm}^{-1}$ nos compostos **8a-c**, **9a,b** e **10a**.

Os espectros de RMN de ^1H dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio apresentam em comum os sinais dos prótons aromáticos, designadamente H-1, H-2, H-3, H-4, H-6, H-8 e H-11 (δ 6,61-8,96 ppm). Relativamente ao H-10 (δ 7,11-7,36 ppm), surge apenas nos compostos **8a-e** e **9a-d**, visto que nos compostos **10a-c** está presente um grupo metilo como substituinte na posição 10, que surge na forma de um singlete ou multipeto (δ 2,22-2,35 ppm). Em relação aos substituintes na posição 9 do sistema policíclico dos compostos **8a-e** e **9a-d**, os prótons do grupo metilo terminal surgem na forma de um tripeto ou multipeto (δ 1,02-1,12 ppm), os prótons do grupo CH_2 adjacente surgem na forma de um quinteto ou multipeto (δ 1,68-1,90 ppm) e os prótons do grupo CH_2 diretamente ligado ao nitrogénio surgem na forma de um tripeto ou multipeto (δ 3,38-3,70 ppm). Relativamente aos compostos **10a-c**, que apresentam um grupo etilo como substituinte na amina da posição 9 em vez de um grupo propilo, os prótons do grupo CH_2 diretamente ligado ao nitrogénio surgem na mesma zona que os análogos **8a-e** e **9a-d** (δ 3,47-3,60 ppm), na forma de quartetos ou de multipetos. Os prótons do grupo CH_3 terminal surgem como um tripeto ou multipeto (δ 1,32-1,39 ppm).

Os compostos **8e**, **9d** e **10c** não apresentam qualquer substituinte na amina da posição 5 do sistema policíclico. Quanto aos restantes compostos, todos apresentam o grupo propilo, sendo que os compostos **8a-c**, **9a-b** e **10a** apresentam ainda a sulfonamida e o substituinte respetivo ligados ao grupo sulfonilo. Os prótons do grupo metileno central do espaçador, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, surgem na forma de um quinteto, multipeto ou singlete alargado (δ 2,00-2,32 ppm), enquanto os prótons adjacentes $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ surgem na forma de um tripeto, multipeto ou singlete alargado (δ 3,06-3,33 ppm) e $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ surgem como um tripeto, multipeto ou singlete alargado (δ 3,74-3,87 ppm).

As benzo[*a*]fenoxazinas **8a**, **9a** e **10a** que partiram do derivado **6a** apresentam o grupo sulfonilo ligado ao grupo propilo, pelo que os seus espectros mostram os sinais dos prótons metílicos na forma de um tripleto ou multipeto (δ 1,02-1,12 ppm) e os sinais dos prótons metilénicos $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ na forma de um sexteto ou multipeto (δ 1,74-1,90 ppm) e $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ como um tripleto ou multipeto (δ 3,02-3,10 ppm).

Relativamente aos compostos **8b**, **8c** e **9b**, obtidos a partir dos derivados **6b** e **6c**, são exibidos os prótons aromáticos do anel ligado ao grupo sulfonilo. Os compostos **8b** e **9b** possuem o mesmo substituinte na posição 5, apresentando o sinal dos prótons do grupo metilo da posição 4 do anel aromático na forma de um singleto (δ 2,36 e 2,38 ppm), bem como pelos prótons aromáticos (δ 7,34 ppm, *orto*-CH₃ e δ 7,71-7,76 ppm, *meta*-CH₃). O composto **8c** possui o grupo nitro em vez do grupo metilo presente nos dois compostos anteriores, cujo efeito eletroretirador desloca os prótons aromáticos da posição *orto* para um desvio químico superior (δ 8,33 ppm) relativamente aos prótons da posição *meta* (δ 8,08 ppm).

Os espectros de RMN de ¹³C mostram os sinais dos carbonos aromáticos comuns a todos os compostos, característicos do núcleo de benzo[*a*]fenoxazina (δ 94,01-164,62 ppm). É possível observar as diferenças entre os compostos com um grupo metilo como substituinte na posição 10 do sistema policíclico (**10a** e **10b**) e os restantes através da variação do desvio químico do C-10 de 112,02-117,55 ppm para 149,03-149,64 ppm.

Em relação aos substituintes na amina da posição 9, os compostos **8a-e** apresentam os sinais do grupo propilo, designadamente do terminal metilo $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ (δ 11,41-11,54 ppm), assim como dos carbonos metilénicos $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ (δ 21,76-21,95 ppm) e $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ (δ 54,53 e 54,76 ppm). Estes valores são ligeiramente diferentes dos valores para os compostos com apenas um grupo propilo como substituinte (**9a-d**), que exibem o sinal do carbono CH₃ terminal a δ 11,52-11,80 ppm, do carbono CH₂ central a δ 23,03-23,55 ppm e do grupo CH₂ diretamente ligado à amina a δ 46,16-46,49 ppm.

Tal como nos espectros de próton, os compostos **10a,b** apresentam valores de desvios químicos diferentes dos restantes devido aos diferentes substituintes que possuem. O carbono do grupo metilo na posição 10 surge a δ 17,61-17,96 ppm, enquanto os sinais do grupo etilo surgem a δ 14,12-14,20 ppm para o CH₃ e a δ 39,71-39,85 ppm para o CH₂.

Relativamente à posição 5, os sinais dos carbonos metilénicos do grupo propilamina dos compostos **8a-d**, **9a-c** e **10a,b** surgem a δ 26,56-30,76 ppm ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), δ 42,28-43,18 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$) e δ 38,35-41,58 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$). Os compostos **8a**, **9a** e **10a**

apresentam os sinais dos carbonos do grupo propilo ligados ao grupo sulfonilo, designadamente o carbono metílico (δ 13,21-13,25 ppm) e os carbonos metilénicos a δ 18,39-18,41 ppm ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) e δ 54,44-54,45 ppm ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). Por outro lado, os compostos **8b** e **9b** exibem os sinais do grupo metilo presente no anel aromático ligado ao grupo sulfonilo (δ 21,40-21,45 ppm) e os sinais dos carbonos aromáticos (δ 128,07-128,08 ppm, *meta*-CH₃ e δ 130,77-130,80 ppm, *orto*-CH₃). No caso do composto **8c**, estes sinais são também exibidos (δ 125,45 ppm, *orto*-CH₃ e δ 129,44 ppm, *meta*-CH₃).

2.5 Caracterização fotofísica dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

A caracterização fotofísica dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** foi realizada em etanol, água e a vários valores de pH, nomeadamente 3, 5, 7,4 e 8,5. A escolha dos solventes teve em atenção o facto de estes compostos terem potencial aplicação como sondas fluorescentes para marcação de estruturas celulares e a importância da avaliação do seu comportamento fotofísico em ambientes variados, incluindo a valores de pH diferentes. O valor de pH de 7,4 é tido como pH fisiológico e é o valor de pH do citoplasma celular mas o vacúolo, por exemplo, é um organelo que apresenta um ambiente diferente do citoplasmático, apresentando um pH aproximadamente de 5.

2.5.1 Estudos de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

Inicialmente, foram traçados os espectros de absorção de radiação na região UV/Vis dos vários cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio nos diferentes solventes, obtidos os valores de comprimento de onda de absorção máxima (λ_{abs}) e calculados os coeficientes de extinção molar (ϵ) correspondentes. Os dados de absorção estão compilados nas Tabelas 1-3.

Em etanol, é possível observar um desvio batocrómico nos valores de comprimento de onda de absorção máxima dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e** (629-641 nm) relativamente aos restantes compostos (609-631 nm) (Tabela 1, Figura 22). Este resultado mostra que a presença de duas cadeias alquílicas na posição 9 do sistema policíclico se traduz num aumento do valor de λ_{abs} . É de realçar ainda um pequeno desvio hipsocrómico do comprimento de onda de absorção máxima dos compostos **8e** (629 nm) e **9d** (609 nm) relativamente aos compostos com o mesmo tipo substituição na posição 9,

8a-d (637-641 nm) e **9a-c** (621-631 nm), respetivamente. Estes resultados mostram que a ausência de substituintes na posição 5 poderá estar associada a uma diminuição do valor de λ_{abs} .

Verifica-se ainda que os pares de compostos **8a** e **8d**, **9a** e **9c** e **10a** e **10b** apresentam valores muito semelhantes de comprimentos de onda de absorção máxima, revelando que a introdução do grupo sulfonamida com o grupo propilo (**8a**, **9a** e **10a**) não se traduz em diferenças significativas nas propriedades de absorção face aos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio apenas com o substituinte propilamina na amina da posição 5 (**8d**, **9c** e **10b**).

Tabela 1. Dados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em etanol e em etanol acidificado com TFA.

| Composto | Etanol | | Etanol acidificado com TFA | |
|------------|-----------------------------|---|-----------------------------|---|
| | λ_{abs} (nm) | ε (M ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_{abs} (nm) | ε (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
| 8a | 638 | 36205 | 639 | 37683 |
| 8b | 640 | 22377 | 640 | 53117 |
| | 512 | 14132 | | |
| 8c | 641 | 52416 | 641 | 60916 |
| 8d | 637 | 12296 | 639 | 39920 |
| | 512 | 10632 | | |
| 8e | 629 | 67500 | 629 | 67500 |
| 9a | 624 | 49188 | 626 | 58250 |
| 9b | 631 | 24250 | 633 | 31500 |
| 9c | 621 | 12434 | 622 | 32301 |
| | 492 | 24019 | | |
| 9d | 609 | 56052 | 609 | 65800 |
| | 489 | 25398 | | |
| 10a | 627 | 34013 | 627 | 39611 |
| 10b | 627 | 12680 | 627 | 14180 |
| | 530 | 2530 | | |

Como referido anteriormente, os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio podem surgir na sua forma catiónica (ácida) ou neutra (básica). Em etanol é possível verificar em alguns dos compostos estudados a presença da forma básica através de uma banda na região dos 489-530 nm (Figura 22). Em dez dos onze compostos verificou-se que a forma predominante é a forma ácida, que apresenta uma banda na região de 609-641 nm. No entanto, decidiu-se acidificar por adição de ácido trifluoroacético (TFA) todas as soluções em etanol, de forma a obter apenas a forma ácida dos compostos (Figura 23). Em todos os

casos observa-se apenas uma banda no espectro de absorção, correspondente à forma ácida, sendo que nos casos dos compostos que apresentavam a banda da forma básica (**8b**, **8d**, **9c**, **9d** e **10b**), o coeficiente de extinção molar da forma ácida sofreu um aumento considerável. Os valores de comprimento de onda de absorção máxima da forma ácida não sofreram alterações significativas, tal como era expectável.

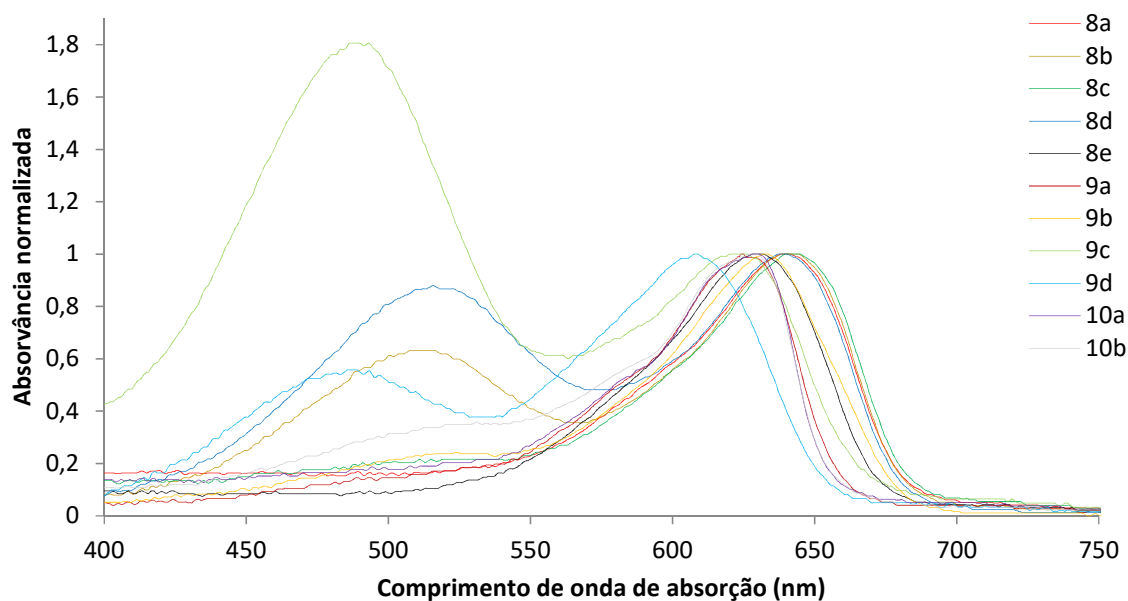


Figura 22. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[a]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em etanol.

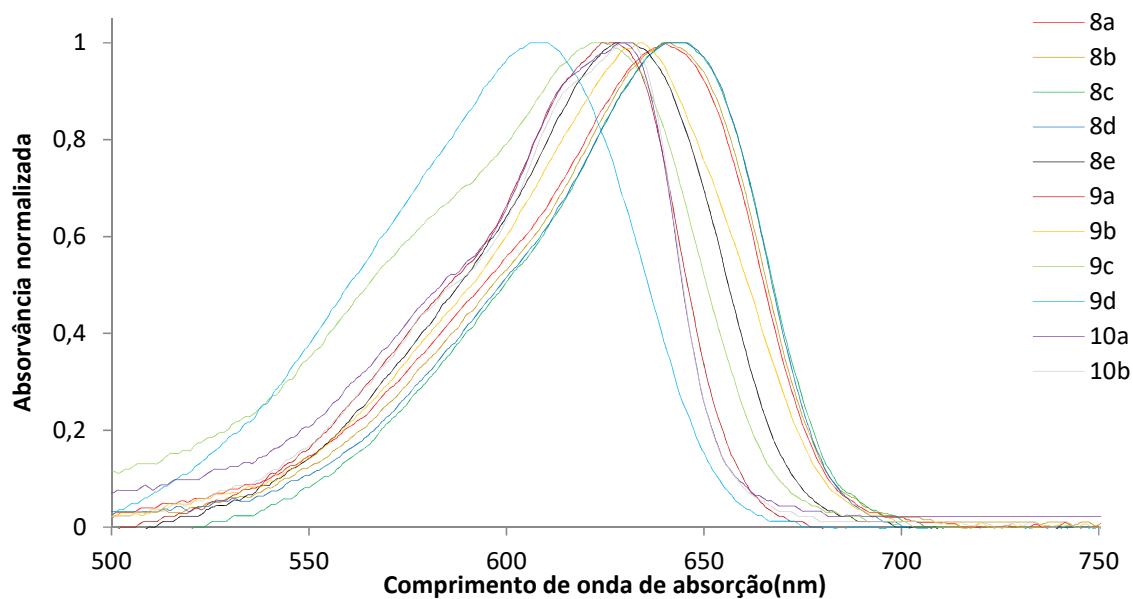


Figura 23. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[a]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em etanol acidificado com TFA.

Na Tabela 2 são apresentados os dados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em água. Neste solvente, é possível verificar uma diminuição geral dos coeficientes de extinção molar relativamente aos valores obtidos em etanol. Os valores de comprimento de onda de absorção máxima registam um desvio batocrómico dos valores dos compostos **8a-e** (637-655 nm), que apresentam duas cadeias alquílicas na posição 9, face aos valores em etanol (629-641 nm). Este aumento do valor de λ_{abs} não ocorre nos compostos mono-alquilados, sendo que estes valores se mantêm praticamente iguais.

Tabela 2. Dados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em água.

| Composto | Água | |
|------------|-----------------------------|--|
| | λ_{abs} (nm) | ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
| 8a | 648 | 16250 |
| 8b | 651 | 18750 |
| 8c | 655 | 21250 |
| 8d | 647 | 15250 |
| 8e | 637 | 47775 |
| 9a | 624 | 22000 |
| 9b | 621 | 10000 |
| 9c | 619 | 15605 |
| 9d | 608 | 30250 |
| 10a | 628 | 11500 |
| 10b | 624 | 5000 |

Na Figura 24 são apresentados os espectros de absorção dos compostos **8a-e**, **9a-d** e **10a-b**, em água. É possível observar a presença de um “ombro” nos espectros de alguns compostos, que resultam da presença de agregados H. Estes agregados praticamente não fluorescem, o que indicia que a fluorescência destes compostos será menor em água do que em etanol.

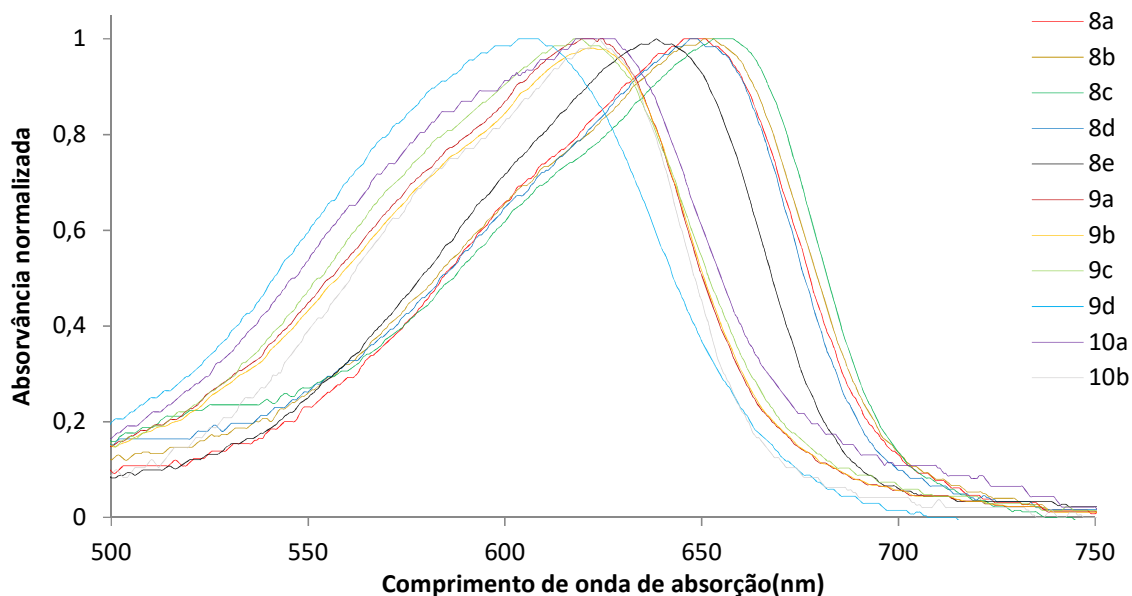


Figura 24. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em água.

Na Tabela 3 são apresentados os dados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** nos diferentes valores de pH testados. Este estudo permitiu verificar que os valores de comprimento de onda de absorção máxima não apresentam diferenças significativas relativamente aos valores obtidos em água. Os coeficientes de extinção molar são, de forma geral, inferiores aos obtidos em etanol e, em quase todos os casos, vão diminuindo com o aumento do pH.

Os compostos **8b**, **8c** e **9b** apresentam ainda uma banda relativa à forma básica ($\lambda_{\text{abs}} = 513\text{-}550\text{ nm}$) a valores de pH mais elevados (pH 7,4 e 8,5), devido à desprotonação do catião derivada do aumento do pH. O coeficiente de extinção molar desta banda, pelo contrário, aumenta com o aumento do pH, como esperado, mostrando o aumento da concentração da forma básica.

Tabela 3. Dados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH3, 5, 7,4 e 8,5.

| Comp | pH 3 | | pH 5 | | pH 7,4 | | pH 8,5 | |
|------------|-------------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|---|
| | λ_{abs} (nm) | ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_{abs} (nm) | ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_{abs} (nm) | ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_{abs} (nm) | ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
| 8a | 647 | 28711 | 647 | 26875 | 647 | 22750 | 648 | 19750 |
| 8b | 651 | 37338 | 651 | 28125 | 652 | 10250 | 650 | 5250 |
| 8c | 653 | 24000 | 655 | 27250 | 537 | 8250 | 513 | 10977 |
| | | | | | 656 | 23500 | 653 | 10500 |
| | | | | | 550 | 14796 | 522 | 17000 |
| 8d | 648 | 33200 | 650 | 36266 | 648 | 33622 | 648 | 25738 |
| 8e | 637 | 51250 | 638 | 56222 | 639 | 62425 | 639 | 52513 |
| 9a | 625 | 46111 | 624 | 35988 | 624 | 31175 | 625 | 38722 |
| 9b | 635 | 19250 | 634 | 16250 | 634 | 10500 | 625 | 8500 |
| | | | | | 526 | 5000 | 522 | 6500 |
| 9c | 620 | 22780 | 622 | 21250 | 621 | 17250 | 620 | 9000 |
| 9d | 611 | 35478 | 610 | 33672 | 610 | 35093 | 611 | 30839 |
| 10a | 625 | 31138 | 627 | 23250 | 621 | 25000 | 625 | 21000 |
| 10b | 625 | 10500 | 625 | 11500 | 627 | 8000 | 625 | 6750 |

Nas Figuras 25-28 é possível observar os espectros de absorção dos compostos nos diferentes valores de pH testados. A pH 3 e pH 5 os espectros mostram apenas a forma ácida de todos os compostos, enquanto a pH 7,4 já é revelada uma banda relativa à forma básica para os compostos **8b**, **8c** e **9b**. A pH 8,5 a banda da forma básica é bastante maior, sendo que no caso do composto **8b** é mais de duas vezes superior à banda da forma ácida. Salienta-se também a presença do ombro originado pelos agregados H dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio em vários espectros.

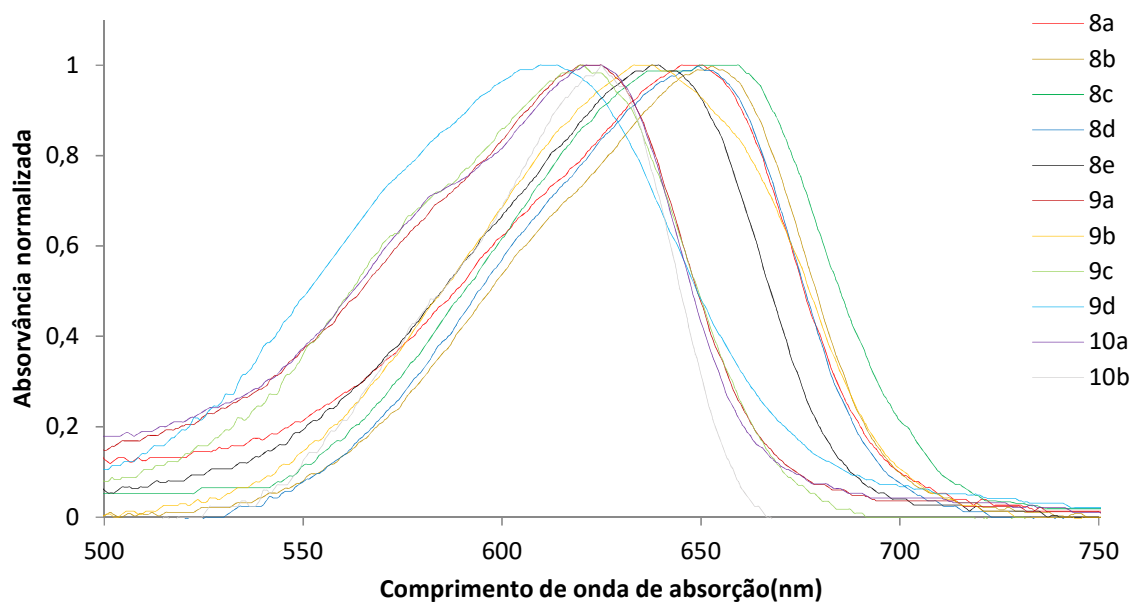


Figura 25. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 3.

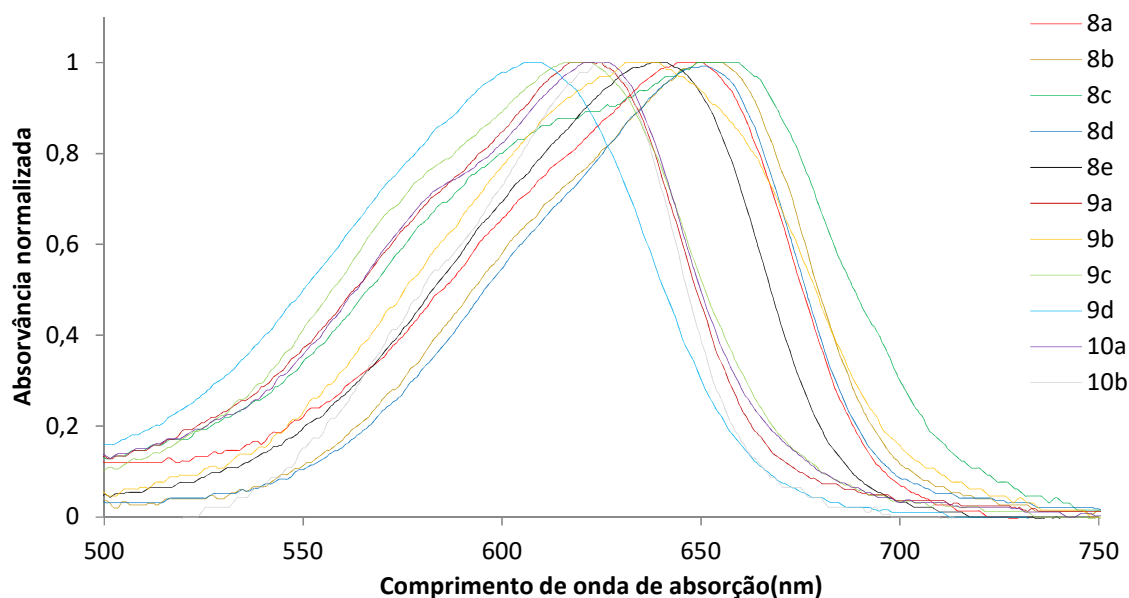


Figura 26. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 5.

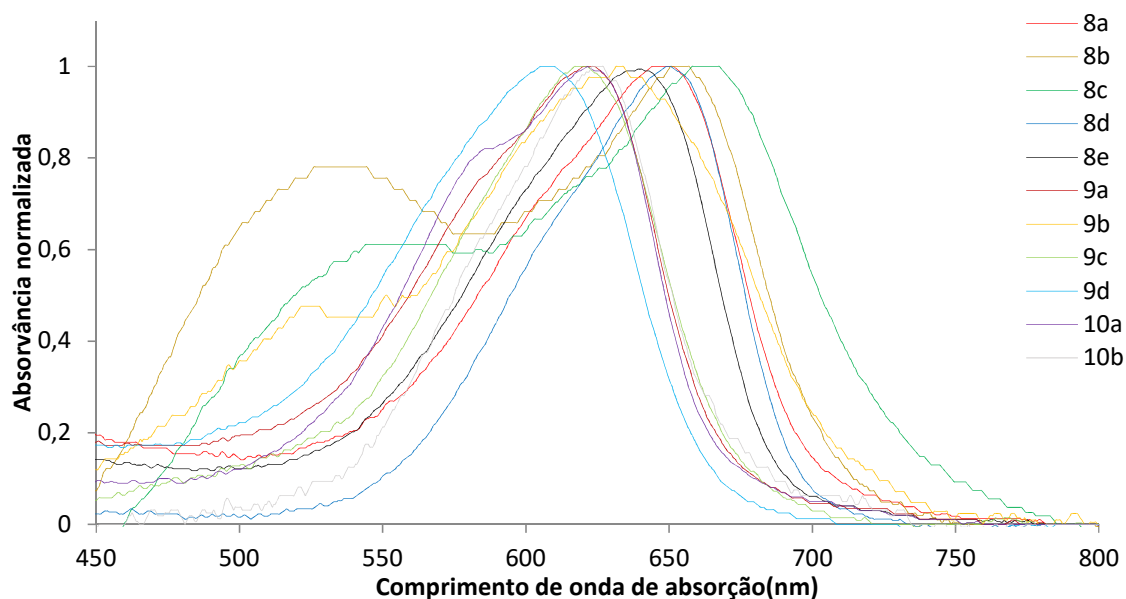


Figura 27. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 7,4.

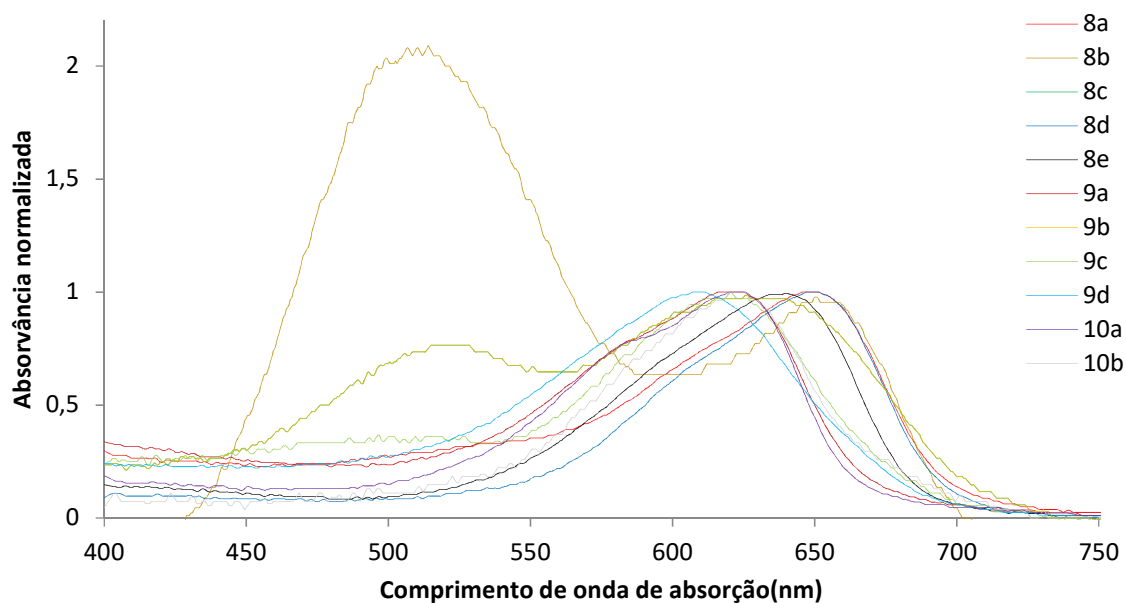


Figura 28. Espectros normalizados de absorção dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 8,5.

De forma geral, é possível observar que os compostos com duas cadeias alquílicas (**8a-e**) apresentam um desvio batocrômico no comprimento de onda de absorção máxima face aos restantes compostos, sendo que em água esse desvio é ainda mais acentuado. Os compostos **8e** e **9d**, que não possuem substituintes na posição 5, apresentam um desvio hipsocrômico do comprimento de onda em

todos os solventes relativamente aos compostos com o mesmo tipo de substituição na posição 9, mostrando que a presença de substituintes nesta posição também aumenta o comprimento de onda. Os compostos **8a**, **9a** e **10a**, que contêm um grupo sulfonilo ligado a uma cadeia de três carbonos apresentam um comportamento muito semelhante aos análogos que possuem o grupo propilamina, mas sem o grupo sulfonamida (**8d**, **9c** e **10b**), o que mostra que a introdução do grupo sulfonamida não provoca alterações significativas nas propriedades fotofísicas. Já as sulfonamidas aromáticas (**8b**, **8c** e **9d**) apresentam um comportamento ligeiramente diferente, tendo um comprimento de onda de absorção máxima superior (2-10 nm) em todos os ambientes testados e revelando ainda uma maior concentração da forma básica da molécula a valores de pH mais elevados.

2.5.2 Estudos de fluorescência dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

Foram ainda traçados os espetros de emissão de fluorescência nas mesmas condições usadas nos estudos de absorção, com excitação a 590 nm. Foram obtidos os valores de comprimento de onda de emissão máxima (λ_{emi}) e as áreas da curva de fluorescência, sendo ainda calculados os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f), usando a Oxazina 1 ($\Phi_f = 0,11$, em etanol)³ como padrão, e os desvios de Stokes ($\Delta\lambda$) de cada composto com base nos dados de absorção. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 4-6.

Em etanol, os valores de λ_{emi} , tal como os valores de λ_{abs} , são superiores para os compostos di-alquilados **8a-e** (661-671 nm) relativamente aos compostos mono-alquilados (642-649 nm). No entanto, estes compostos apresentam valores de rendimento quântico de fluorescência Φ_f (0,15-0,19) inferiores aos compostos que apresentam apenas uma cadeia alquílica como substituinte (Φ_f 0,30-0,55). Os desvios de Stokes $\Delta\lambda$ surgem entre 15 (**10a**) e 38 nm (**9d**).

Por comparação destes resultados com os resultados obtidos em etanol acidificado, não se observam diferenças significativas nos valores de λ_{emi} (643-671 nm), Φ_f (0,18-0,58) e $\Delta\lambda$ (13-37 nm).

Tabela 4. Dados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em etanol e em etanol acidificado com TFA.

| Composto | Etanol | | | Etanol acidificado com TFA | | |
|------------|-----------------------------|----------|----------------------|-----------------------------|----------|----------------------|
| | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) |
| 8a | 669 | 0,17 | 31 | 670 | 0,18 | 31 |
| 8b | 671 | 0,17 | 31 | 669 | 0,19 | 29 |
| 8c | 671 | 0,15 | 30 | 671 | 0,19 | 30 |
| 8d | 669 | 0,19 | 32 | 669 | 0,18 | 30 |
| 8e | 661 | 0,16 | 32 | 662 | 0,20 | 33 |
| 9a | 645 | 0,51 | 21 | 645 | 0,52 | 19 |
| 9b | 647 | 0,33 | 16 | 646 | 0,32 | 13 |
| 9c | 649 | 0,30 | 28 | 655 | 0,35 | 33 |
| 9d | 647 | 0,49 | 38 | 646 | 0,47 | 37 |
| 10a | 642 | 0,55 | 15 | 643 | 0,58 | 16 |
| 10b | 643 | 0,54 | 16 | 644 | 0,58 | 17 |

Nas Figuras 29 e 30 estão apresentados os espectros normalizados de emissão em etanol e etanol acidificado dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**. É possível observar que não se verificam diferenças significativas entre os dois gráficos.

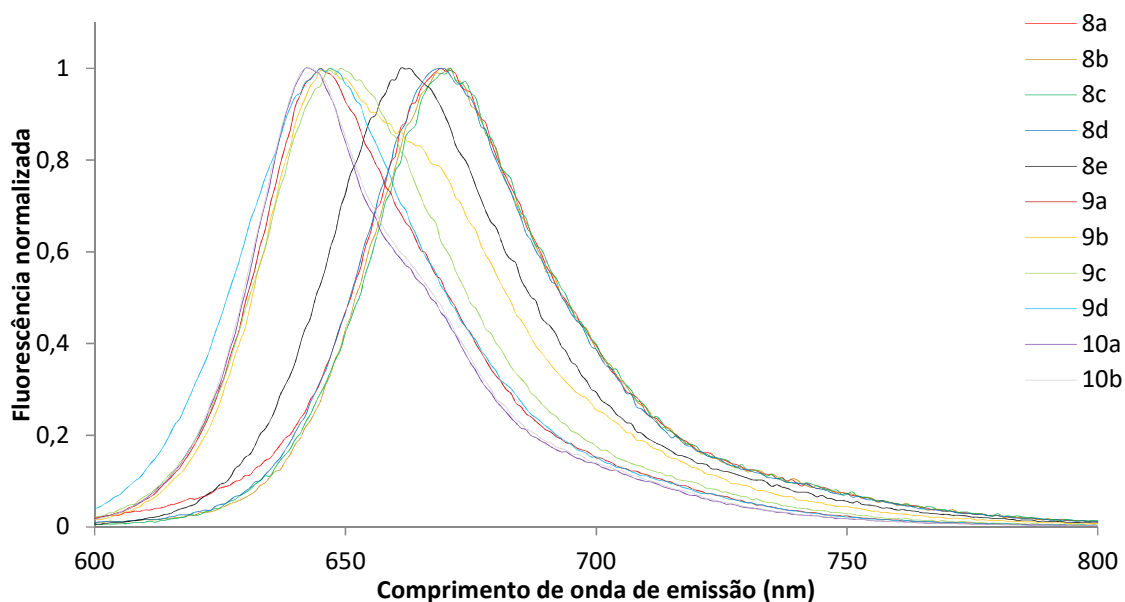


Figura 29. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em etanol.

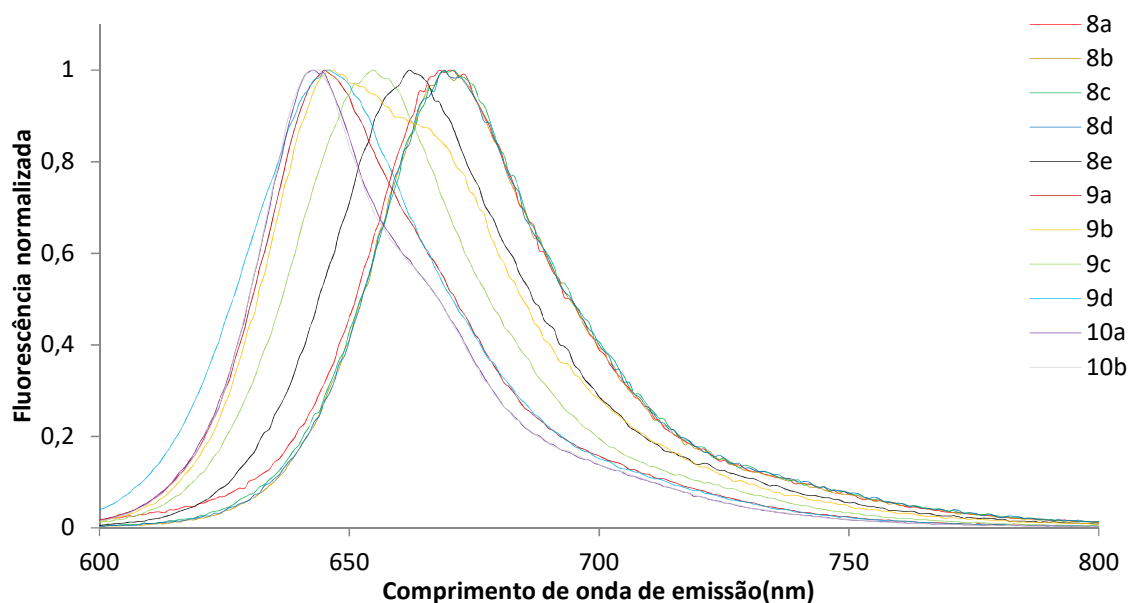


Figura 30. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em etanol acidificado com TFA.

Na Tabela 5 são apresentados os dados de emissão dos onze compostos em água. Neste solvente, os rendimentos quânticos de fluorescência revelam uma drástica redução. Tal como em etanol, os valores para os compostos di-alkilados (Φ_F até 0,02) são inferiores aos restantes (Φ_F 0,01-0,21).

Tabela 5. Dados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em água.

| Composto | Água | | |
|------------|----------------------|----------|----------------------|
| | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) |
| 8a | 681 | 0,02 | 33 |
| 8b | 687 | 0,02 | 36 |
| 8c | 682 | <0,01 | 27 |
| 8d | 680 | 0,02 | 33 |
| 8e | 679 | 0,02 | 42 |
| 9a | 653 | 0,14 | 29 |
| 9b | 652 | 0,01 | 31 |
| 9c | 659 | 0,09 | 40 |
| 9d | 653 | 0,10 | 45 |
| 10a | 650 | 0,12 | 22 |
| 10b | 651 | 0,21 | 27 |

Os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** revelam um desvio batocrômico no comprimento de onda de emissão máxima relativamente aos dados obtidos em etanol. No caso dos compostos **8a-e** os valores de λ_{emi} situam-se entre 679 e 687 nm e nos compostos **9a-d** e **10a,b** entre 650 e 659 nm. Neste caso, tanto o composto **8e** como o composto **9d**, cujos valores de λ_{abs} apresentam um desvio hipsocrômico face aos análogos, registam valores de λ_{emi} semelhantes aos restantes compostos da mesma série, revelando, portanto, um valor superior de desvio de Stokes.

Na Figura 31 são apresentados os espectros normalizados de emissão dos compostos **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em água, sendo possível observar o referido desvio batocrômico no valor de comprimento de onda de emissão máxima para todos os compostos.

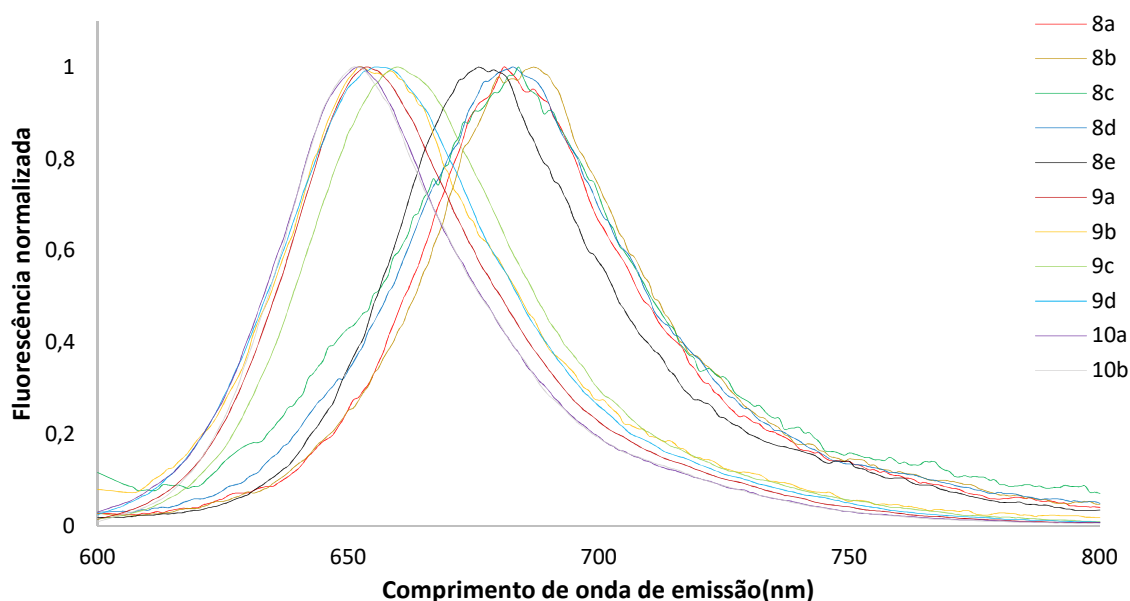


Figura 31. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** em água.

Os dados de emissão dos compostos **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** nas soluções de pH variável (3, 5, 7,4 e 8,5) são apresentados na Tabela 6. É possível observar que os valores de comprimento de onda de emissão máxima não sofrem variações significativas com a variação do pH e são semelhantes aos valores obtidos em água, para todos os compostos. Em relação aos rendimentos quânticos de fluorescência, destaca-se a diminuição do seu valor com o aumento do pH (Φ_f 0,02-0,37 a pH 3; Φ_f 0,01-0,33 a pH 5; Φ_f 0,01-0,24 a pH 7,4; Φ_f 0,01-0,20 a pH 8,5), em quase todos os casos. Este facto resulta da diminuição da concentração da forma ácida dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio e do consequente aumento da forma básica que praticamente não fluoresce.

Tabela 6. Dados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 3, 5, 7,4 e 8,5.

| Comp | pH 3 | | | pH 5 | | | pH 7,4 | | | pH 8,5 | | |
|------------|-------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|----------|-------------------------|
| | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) | λ_{emi} (nm) | Φ_F | $\Delta\lambda$ (nm) |
| 8a | 677 | 0,03 | 30 | 680 | 0,03 | 33 | 676 | 0,03 | 29 | 682 | 0,02 | 34 |
| 8b | 680 | 0,04 | 29 | 681 | 0,03 | 30 | 683 | 0,01 | 31 | 677 | 0,01 | 27 |
| 8c | 684 | 0,02 | 31 | 685 | 0,01 | 30 | 686 | 0,02 | 30 | 683 | 0,01 | 30 |
| 8d | 673 | 0,05 | 25 | 682 | 0,03 | 32 | 683 | 0,03 | 35 | 682 | 0,02 | 34 |
| 8e | 674 | 0,03 | 37 | 675 | 0,03 | 37 | 675 | 0,02 | 36 | 675 | 0,02 | 36 |
| 9a | 654 | 0,18 | 29 | 654 | 0,18 | 30 | 652 | 0,15 | 28 | 652 | 0,14 | 27 |
| 9b | 657 | 0,10 | 22 | 654 | 0,07 | 20 | 655 | 0,06 | 21 | 655 | 0,04 | 30 |
| 9c | 658 | 0,14 | 38 | 660 | 0,11 | 38 | 658 | 0,12 | 37 | 656 | 0,10 | 36 |
| 9d | 654 | 0,11 | 43 | 654 | 0,13 | 44 | 656 | 0,12 | 46 | 656 | 0,10 | 45 |
| 10a | 651 | 0,24 | 26 | 651 | 0,22 | 24 | 649 | 0,20 | 28 | 650 | 0,20 | 25 |
| 10b | 651 | 0,37 | 26 | 651 | 0,33 | 26 | 651 | 0,24 | 24 | 651 | 0,20 | 26 |

Nas Figuras 32-35 são apresentados os espectros normalizados de emissão dos compostos **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** nos diferentes valores de pH testados. Em certos casos, alguns compostos (**8a-e**) apresentam um espectro com menor definição devido à sua fraca intensidade de fluorescência. É possível observar ainda nos quatro gráficos a diferença clara entre os comprimentos de onda de emissão máxima dos compostos di-alkilados (**8a-e**) face aos mono-alkilados (**9a-d** e **10a,b**).

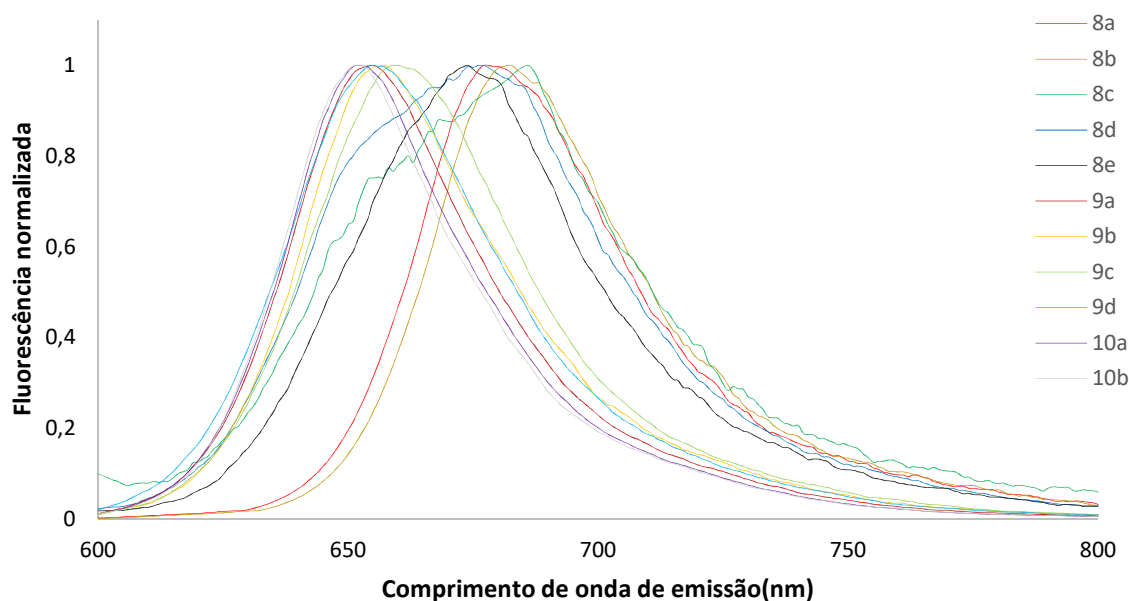


Figura 32. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 3.

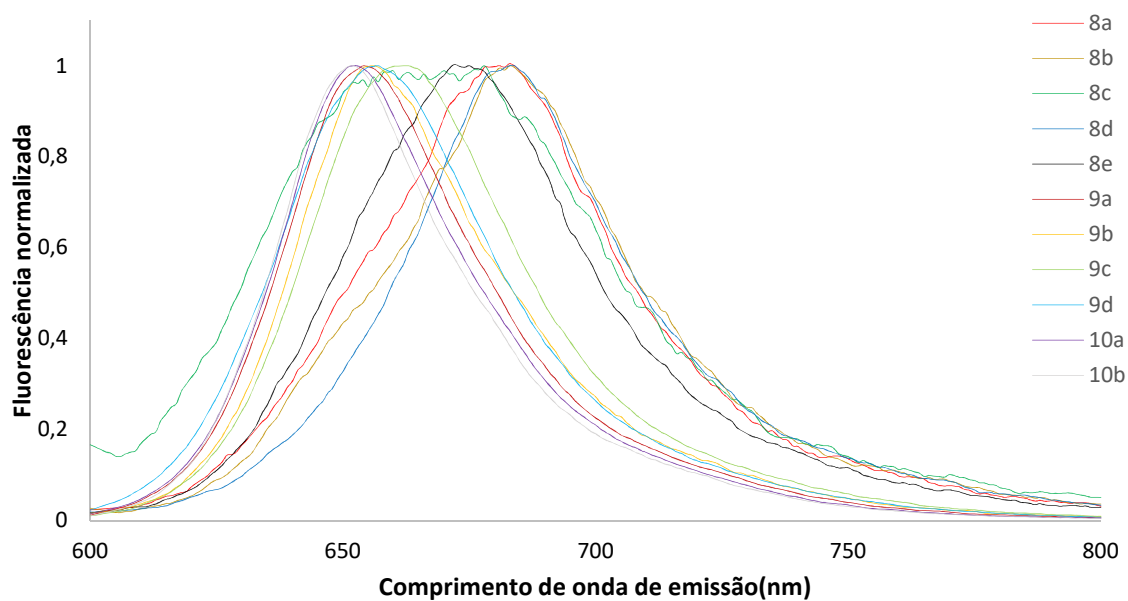


Figura 33. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 5.

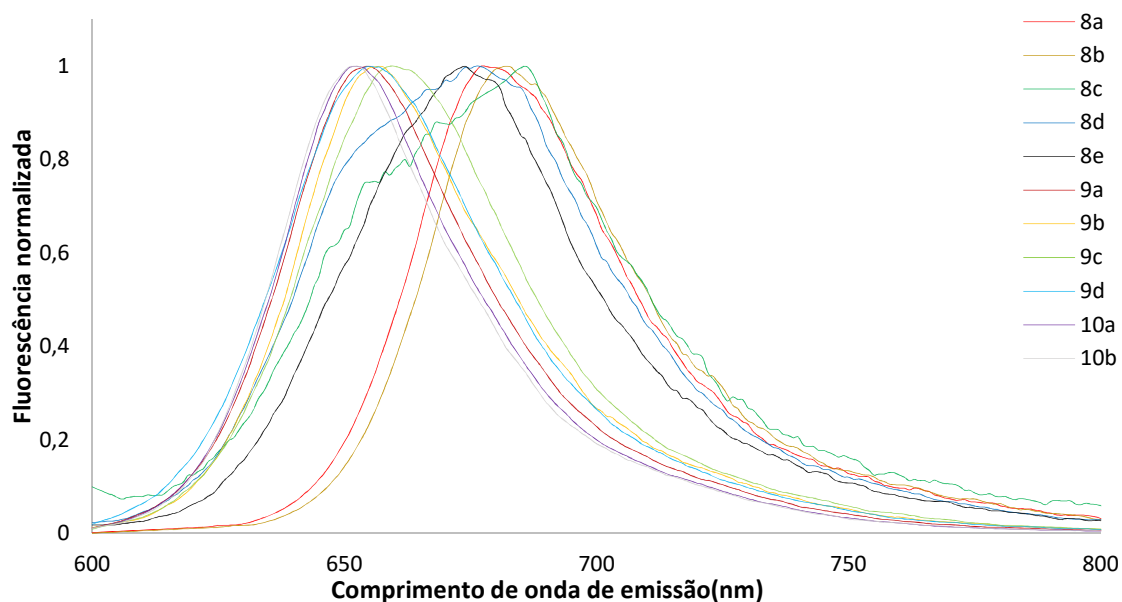


Figura 34. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 7,4.

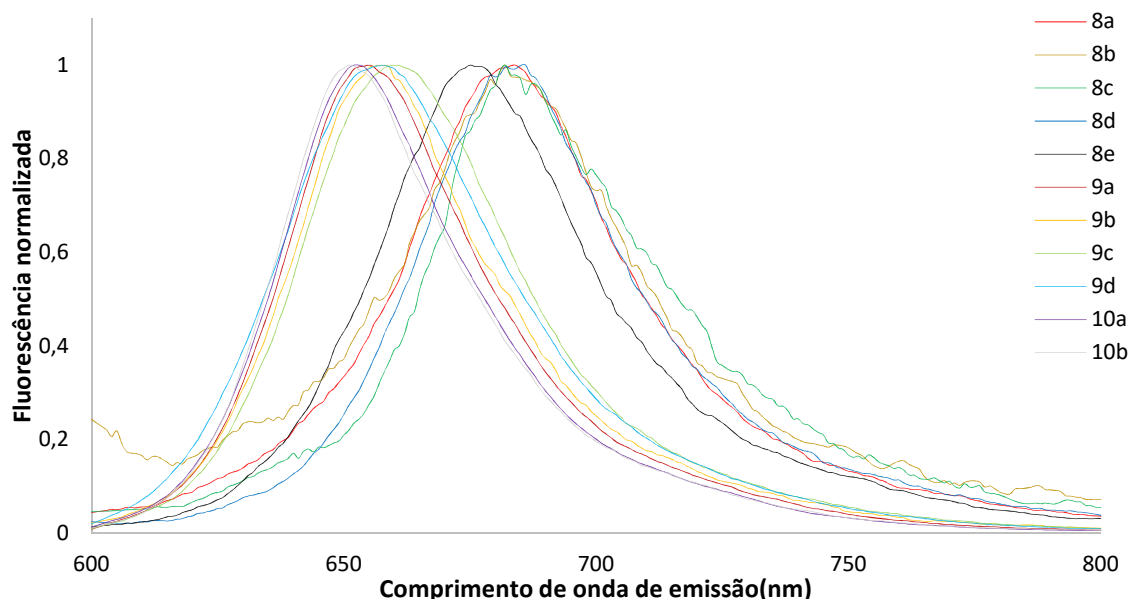


Figura 35. Espectros normalizados de emissão dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** a pH 8,5.

De um modo geral, os valores de comprimento de onda de emissão máxima estão compreendidos entre 642 e 687 nm, sendo a maior diferença observada entre os compostos com duas cadeias alquílicas na posição 9 (**8a-e**), que apresentam valores de λ_{emi} na região 661-671 nm em etanol e 673-687 nm em água, comparativamente aos valores dos compostos com apenas uma cadeia alquílica na mesma posição (**9a-d** e **10a,b**), que apresentam valores de λ_{emi} entre 642-655 nm em etanol e 649-660 nm em água. É possível ainda observar um desvio batocrômico dos valores de λ_{emi} em água, o que poderá estar relacionado com a sua elevada capacidade de doar prótons e estabelecer pontes de hidrogénio.

Os rendimentos quânticos de fluorescência são, de forma geral, mais elevados em etanol (Φ_f 0,15-0,58) do que em água (Φ_f 0,01-0,21) e nas soluções aquosas de pH variado (Φ_f 0,01-0,37), como esperado, devido à menor solubilidade dos compostos e à formação de agregados H que não fluorescem. Os compostos **9a-d** e **10a,b** são os que apresentam valores mais elevados.

2.6 Ensaios de atividade antifúngica dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

Como já referido, as benzo[*a*]fenoxazinas possuem atividade antifúngica e vários derivados já sintetizados pelo grupo de trabalho mostraram atividade antiproliferativa contra a levedura

Saccharomyces cerevisiae.^{26,57,58} Trabalho anteriormente publicado pelo grupo mostrou que uma benzo[*a*]fenoxazina incorporando o grupo sulfonamida também se apresentava como promissor agente antiproliferativo.²⁶ Desta forma, os seis novos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio possuindo o grupo sulfonamida (**8a-c**, **9a,b** e **10a**), bem como os cinco compostos sintetizados para comparação (**8d,e**, **9c,d** e **10b**), foram usados em estudos de atividade antiproliferativa através da determinação dos valores de MIC (*Minimum Inhibitory Concentration* – concentração mínima inibitória), usando como organismo modelo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072. O valor de MIC representa a concentração mínima em que se verifica uma inibição de pelo menos 80% do crescimento celular.

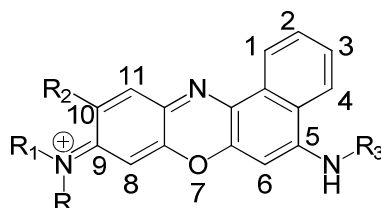
As amostras foram inicialmente diluídas em DMSO, sendo que a concentração final deste solvente foi sempre igual a 0,5%. Esta concentração não influencia o crescimento das células, como confirmado pelo controlo realizado, onde se observou um crescimento celular idêntico ao controlo sem DMSO. Os ensaios foram feitos em meio RPMI-1640 e os compostos foram testados em concentrações entre 3,125 e 100 µM.

Na Tabela 7 são apresentados os valores de MIC dos sais de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** testados. Os valores de MIC dos compostos di-alquilados na posição 9 (**8a-e**) parecem revelar que o grupo substituinte presente na posição 5 não afeta significativamente a atividade antifúngica destes compostos, sendo os valores entre 12,5 e 25 µM. Já nos compostos em que só está presente uma cadeia alquímica na posição 9 (**9a-d** e **10a,b**), quanto maior o tamanho da cadeia na posição 5, menor a atividade biológica do composto.

É possível concluir que a presença do grupo sulfonamida como substituinte nas benzo[*a*]fenoxazinas **8a-c**, **9a,b** e **10a** não se traduz em melhorias significativas na atividade antifúngica dos compostos. Apenas o composto **8b** apresentou um MIC menor (12,5 µM) do que os seus respetivos análogos com a mesma substituição na posição 9 e 10, mas sem o grupo sulfonamida (**8d-e**).

Trabalho previamente publicado pelo grupo onde este trabalho se inseriu⁵⁸ parecia indicar que a presença de dois substituintes alquílicos na amina da posição 9 do sistema policíclico favorecia a atividade antiproliferativa face aos análogos com um substituinte alquílico na mesma posição. Contudo, em relação aos compostos analisados no presente trabalho tal não se confirmou, inclusivamente com o composto **9d**, possuindo apenas uma cadeia alquímica, a apresentar o valor de MIC mais baixo para toda a série (6,25 µM). Estes dados parecem indicar que a atividade de cada composto depende da combinação dos substituintes presentes na posição 5 e 9, não sendo possível uma correlação entre o número de cadeias alquílicas como substituinte na posição 9 e o valor de MIC.

Tabela 7. Valores de MIC dos cloretos de benzo[*a*]fenoxaziníio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072.



| Composto | R | R ₁ | R ₂ | R ₃ | MIC (μM) | Log P |
|------------|---|---|-----------------|---|----------|-------|
| 8a | (CH ₂) ₂ CH ₃ | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NHSO ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃ | 25 | 2,38 |
| 8b | (CH ₂) ₂ CH ₃ | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NHSO ₂ C ₆ H ₄ CH ₃ | 12,5 | 3,49 |
| 8c | (CH ₂) ₂ CH ₃ | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NHSO ₂ C ₆ H ₄ NO ₂ | 25 | 3,00 |
| 8d | (CH ₂) ₂ CH ₃ | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NH ₂ HBr | 25 | 1,15 |
| 8e | (CH ₂) ₂ CH ₃ | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | H | 25 | 1,70 |
| 9a | H | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NHSO ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃ | 50 | 2,32 |
| 9b | H | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NHSO ₂ C ₆ H ₄ CH ₃ | >100* | 3,43 |
| 9c | H | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | (CH ₂) ₃ NH ₂ HBr | 25 | 1,09 |
| 9d | H | (CH ₂) ₂ CH ₃ | H | H | 6,25 | 1,64 |
| 10a | H | CH ₂ CH ₃ | CH ₃ | (CH ₂) ₃ NHSO ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃ | 50 | 2,20 |
| 10b | H | CH ₂ CH ₃ | CH ₃ | (CH ₂) ₃ NH ₂ HBr | 100 | 0,96 |

*O composto **9b** apresentou atividade antifúngica na concentração de 100 μM, não atingindo, no entanto, uma inibição de 80 % do crescimento celular.

O logaritmo do coeficiente de partição entre *n*-octanol e água, Log *P*, é uma medida indicativa da hidrofobicidade de compostos e faz uma estimativa da distribuição destes entre as membranas e o meio aquoso. Assim, os compostos com valores de Log *P* mais pequenos são mais solúveis em água enquanto os compostos com valores superiores têm maior afinidade para os sistemas membranares. Foi efetuada a previsão deste valor para os onze compostos testados usando o *software* online *Molinspiration property engine* v2016.10.¹⁰⁴

A Figura 36 mostra que não existe uma correlação entre os valores de MIC e o coeficiente de partição dos compostos. O composto com Log *P* mais baixo (**10b** - 0,96) apresentou o valor de MIC mais elevado para esta série (100 μM).

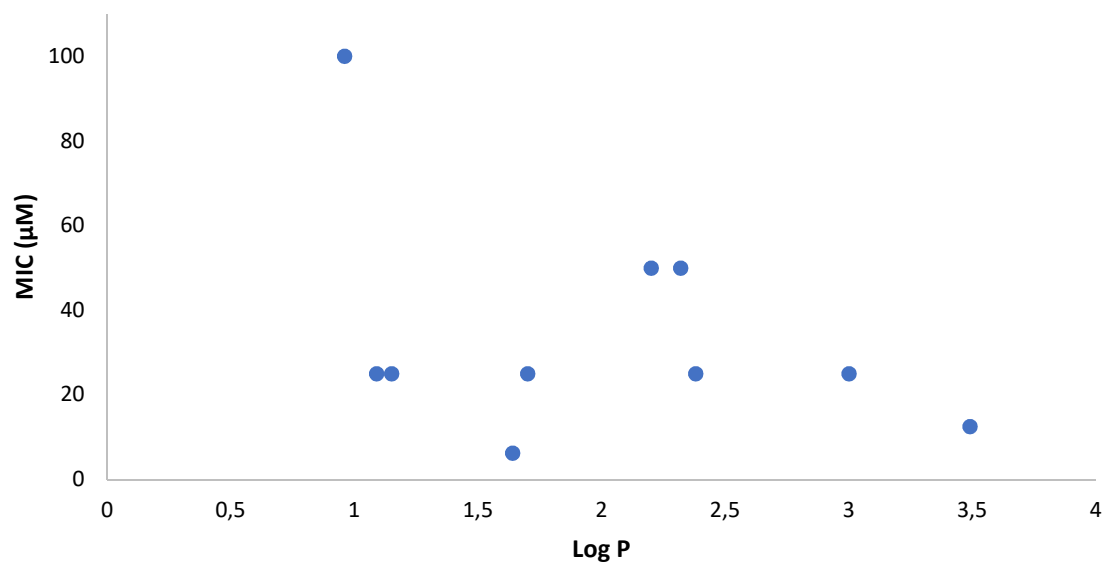


Figura 36. Correlação entre os valores de Log P e de MIC obtidos para os compostos **8a-e**, **9a,c,d** e **10a-b**.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimentos Gerais

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Stuart SMP3. As análises por TLC foram efetuadas em placas de sílica gel com 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel) e na revelação foi usada a detecção visual e luz ultravioleta (λ_{max} 254 e 365 nm) numa câmara CN-6. Nas cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel Acros Organics 60 (0,035-0,070 mm).

Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro BOMEM MB 104. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr 1%.

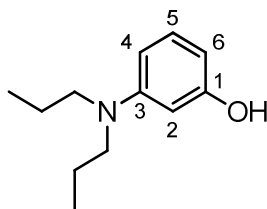
Os espectros de ressonância magnética nuclear foram determinados no aparelho Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C , usando o pico de solvente como referência interna, a 25°C. Os desvios químicos são referidos em ppm, utilizando como referência o valor $\delta_{\text{H}} \text{ Me}_4\text{Si} = 0$ ppm, e as constantes de acoplamento (J) surgem em Hz. A atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C foi efetuada por comparação dos desvios químicos, multiplicidade dos picos e valores de J . Foram ainda usadas técnicas de desacoplamento de dupla ressonância, assim como de correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, nomeadamente HMQC e HMBC. Os solventes deuterados usados foram clorofórmio, dimetilsulfóxido- d_6 e metanol- d_4 com grau de deuteração superior a 99,8%, da euriso-top® ou da Acros Organics.

Os espectros de ultravioleta/visível (200-800 nm) foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu UV/3101PC. Os espectros de fluorescência foram registados num espectralfluorímetro Fluoromax-4.

Os reagentes usados foram produtos *p.a.* ou para síntese das empresas Sigma-Aldrich, BDH Chemicals e Acros Organics e os solventes usados foram produtos *p.a.* fornecidos pela Fisher Chemical, Panreac e Honeywell.

3.2 Síntese dos derivados *N*-substituídos do 3-aminofenol **2a,b**

[2a] 3-(Dipropilamino)fenol



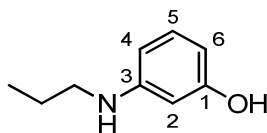
A uma solução de 3-aminofenol (1,00 g, $9,16 \times 10^{-3}$ mol) em etanol (3 mL) foi adicionado 1-bromopropano (0,916 mL, $1,01 \times 10^{-2}$ mol, 1,1 eq.) e a mistura resultante foi aquecida a refluxo num banho de óleo, com agitação. O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1) e, após 6 horas, foi adicionada uma igual quantidade de 1-bromopropano (0,916 mL, $1,01 \times 10^{-2}$ mol, 1,1 eq.). Após um total de 12 horas de aquecimento o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de diclorometano/metanol de polaridade crescente. O composto esperado **2a** foi obtido na forma de um óleo castanho.

$$\eta = 24\% (0,428 \text{ g})$$

$$R_f = 0,78 \text{ (diclorometano/metanol 9:1)}$$

δ_H (CDCl_3 , 400 MHz) 0,94 (t, $J = 7,6$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1,62 (sext, $J = 7,6$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,22 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 5,14 (s alargado, 1H, OH), 6,17 (dd, $J = 8,0$ Hz e 2,4 Hz, 1H, H-6), 6,20 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-2), 6,28 (dd, $J = 8,0$ e 2,4 Hz, 1H, H-4), 7,07 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-5) ppm.

[2b] 3-(Propilamino)fenol



Na reação anterior foi também isolado o composto **2b**, sob a forma de um óleo castanho.

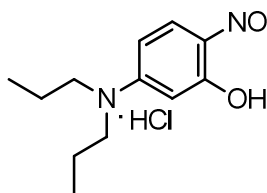
$$\eta = 57\% (0,783 \text{ g})$$

$$R_f = 0,58 \text{ (diclorometano/metanol 9:1)}$$

δ_H (CDCl_3 , 400 MHz) 0,97 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,62 (sext, $J = 7,2$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,91 (s alargado, 2H, OH e NH), 6,20 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-2), 6,26 (dt, $J = 8,0$ e 2,8 Hz, 2H, H-4 e H-6), 7,02 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-5) ppm.

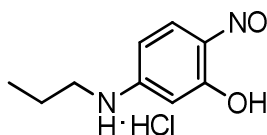
3.3 Síntese dos derivados nitrosados 3a-c

[3a] Hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosafenol



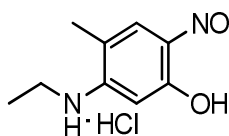
A uma solução de 3-(dipropilamino)fenol **2a** (0,115 g, $5,96 \times 10^{-4}$ mol) a 0°C em etanol (3 mL), foi adicionado ácido clorídrico concentrado (0,5 mL) e uma solução de nitrito de sódio (0,045 g, $6,55 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.) em água (0,5 mL) gota-a-gota, com agitação. A mistura resultante foi mantida nestas condições durante 4 horas e o progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1). O solvente foi evaporado e obteve-se o composto **3a** na forma de um sólido oleoso laranja (0,139 g). Este composto foi usado nas reações seguintes sem qualquer purificação.

[3b] Hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosafenol



A uma solução de 3-(propilamino)fenol **2b** (0,600 g, $3,97 \times 10^{-3}$ mol) a 0°C em etanol (3 mL), foi adicionado ácido clorídrico concentrado (0,5 mL) e uma solução de nitrito de sódio (0,301 g, $4,37 \times 10^{-3}$ mol, 1,1 eq.) em água (0,5 mL) gota-a-gota, com agitação. A mistura resultante foi mantida nestas condições durante 4 horas e o progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1). O solvente foi evaporado e obteve-se o composto **3b** na forma de um sólido oleoso laranja (0,768 g). Este composto foi usado nas reações seguintes sem qualquer purificação.

[3c] Hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosafenol

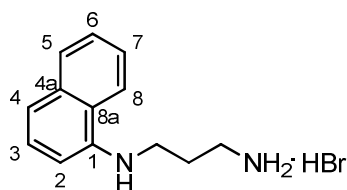


A uma solução de 3-(etilamino)-4-metilfenol **2c** (0,600 g, $3,97 \times 10^{-3}$ mol) a 0°C em etanol (3 mL), foi adicionado ácido clorídrico concentrado (0,5 mL) e uma solução de nitrito de sódio (0,301 g, $4,37 \times 10^{-3}$ mol, 1,1 eq.) em água (0,5 mL) gota-a-gota, com agitação. A mistura resultante foi mantida nestas condições durante 4 horas e o progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol

9:1). O solvente foi evaporado e obteve-se o composto **3c** na forma de um sólido oleoso laranja (0,963 g). Este composto foi usado nas reações seguintes sem qualquer purificação.

3.4 Síntese dos derivados *N*-substituídos da naftalen-1-amina **5**, **6a-c** e **7**

[5] Hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina



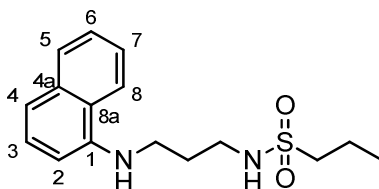
A uma solução de naftalen-1-amina **4** (0,500 g, $3,49 \times 10^{-3}$ mol) em etanol (5 mL) foi adicionado hidrobrometo de 3-bromopropan-1-amina (0,917 g, $4,19 \times 10^{-3}$ mol, 1,2 eq.) e a mistura resultante foi aquecida a refluxo, com agitação. O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1). Após 13 horas, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de diclorometano/metanol de polaridade crescente. O composto esperado **5** foi obtido como um sólido violeta.

η = 17% (0,137 g)

R_f = 0,25 (diclorometano/metanol 9:1)

δ_H (DMSO, 400 MHz) 1,95 (quint, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 2,90-2,99 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 3,30 (t, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 6,55 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-2), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-4), 7,29 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H-3), 7,37-7,46 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,70 (s alargado, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 7,76 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-8), 8,13 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-5) ppm.

[6a] *N*-(3-(Naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida



A uma suspensão de hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,250 g, $8,9 \times 10^{-4}$ mol) em diclorometano (3 mL), a 0°C, com agitação, foi adicionada trietilamina (0,252 mL, $1,96 \times 10^{-3}$ mol, 2,2 eq.) e cloreto de propano-1-sulfonilo (0,110 mL, $9,8 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.). O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1) e, após 7 horas, foram novamente adicionados

trietilamina (0,126 mL, $9,8 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.) e cloreto de propano-1-sulfonilo (0,055 mL, $4,9 \times 10^{-4}$ mol, 0,55 eq.). Após um total de 14 horas, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de diclorometano/metanol de polaridade crescente. O composto esperado **6a** foi obtido na forma de um óleo preto.

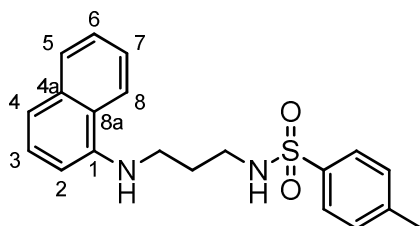
$$\eta = 61\% (0,167 \text{ g})$$

$$R_f = 0,85 \text{ (diclorometano/metanol 9:1)}$$

δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) 1,03 (t, $J = 5,6$ Hz, 3H, $NHSO_2CH_2CH_2CH_3$), 1,77-1,87 (m, 2H, $NHSO_2CH_2CH_2CH_3$), 2,00 (quint, $J = 6,4$ Hz, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$), 2,94-3,04 (m, 2H, $NHSO_2CH_2CH_2CH_3$), 3,25-3,33 (m, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$), 3,46 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$), 4,76 (s alargado, 1H, $NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$), 6,65 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-2), 7,26 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-4), 7,35 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-3), 7,43-7,48 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,78-7,81 (m, 1H, H-8), 7,84-7,89 (m, 1H, H-5) ppm.

δ_C ($CDCl_3$, 100,6 MHz) 12,88 ($NHSO_2CH_2CH_2CH_3$), 17,36 ($NHSO_2CH_2CH_2CH_3$), 29,31 ($NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$), 41,11 ($NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$ e $NHCH_2CH_2CH_2NHSO_2$), 54,39 ($NHSO_2CH_2CH_2CH_3$), 104,75 (C-2), 117,85 (C-4), 119,98 (C-5), 123,61 (C-8a), 124,93 (C-6), 125,82 (C-7), 126,44 (C-3), 128,61 (C-8), 134,32 (C-4a), 142,72 (C-1) ppm.

[6b] 4-Metil-*N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)benzenossulfonamida



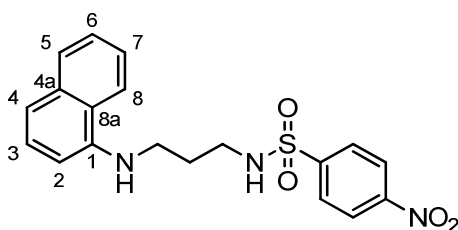
A uma suspensão de hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,100 g, $3,56 \times 10^{-4}$ mol) em diclorometano (3 mL), a 0°C , com agitação, foi adicionada trietilamina (0,100 mL, $7,83 \times 10^{-4}$ mol, 2,2 eq.) e cloreto de 4-metilbenzo-1-sulfonilo (0,056 g, $3,92 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.). O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1). Após 9 horas nestas condições, o solvente foi evaporado e o resíduo obtido purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de diclorometano/metanol com polaridade crescente. Foi obtido o composto esperado **6b** na forma de um óleo castanho escuro que por RMN de ^1H se verificou não estar completamente puro. No entanto, foi usado nesta forma nas reações seguintes.

$m = 0,055 \text{ g}$

$R_f = 0,73$ (diclorometano/metanol 95:5)

δ_H (DMSO- d_6 , 400 MHz) 1,77 (quint, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 2,34 (s, 3H, $\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 2,87 (q, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,16 (q, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 6,01 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 1H, NH), 6,40 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H-2), 7,07 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 7,24 (t, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 7,30-7,43 (m, 4H, H-6, H-7 e 2xAr-H *o*-CH₃), 7,65 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 2H, 2xAr-H *m*-CH₃), 7,72 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H-8), 8,07 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 1H, H-5) ppm.

[6c] *N*-(3-(Naftalen-1-ilamino)propil)-4-nitrobenzenossulfonamida



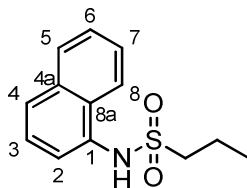
A uma solução de hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,100 g, $3,56 \times 10^{-4}$ mol) em diclorometano (3 mL), a 0°C, com agitação, foi adicionada trietilamina (0,100 mL, $7,83 \times 10^{-4}$ mol, 2,2 eq.) e cloreto de 4-nitrobenzeno-1-sulfonilo (0,087 g, $3,92 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.). O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 9:1). Após 5 horas, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de diclorometano/metanol com polaridade crescente. Foi obtido um óleo castanho escuro cujo espectro de RMN de ^1H mostrou tratar-se do composto **6c**, em mistura com outros compostos, tendo sido usado desta forma na reação seguinte.

$m = 0,063 \text{ g}$

$R_f = 0,79$ (diclorometano/metanol 95:5)

δ_H (DMSO- d_6 , 400 MHz) Sinais identificados relativos ao composto **6c**: 1,75-1,82 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 2,95-3,01 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,10-3,20 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 6,00 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 1H, NH), 6,37 (d, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 1H, H-2), 7,05 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 7,21 (t, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H-3) ppm.

[7] *N*-(Naftalen-1-il)propano-1-sulfonamida



A uma solução de naftalen-1-amina **4** (0,060 g, $4,19 \times 10^{-4}$ mol) em diclorometano (3 mL), a 0°C , com agitação, foi adicionada trietilamina (0,119 mL, $7,83 \times 10^{-4}$ mol, 2,2 eq.) e cloreto de propano-1-sulfonilo (0,052 mL, $4,61 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.). O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano). Após 5 horas, foram novamente adicionados trietilamina (0,119 mL, $7,83 \times 10^{-4}$ mol, 2,2 eq.) e cloreto de propano-1-sulfonilo (0,052 mL, $4,61 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.) e, após um total de 12 horas, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de éter de petróleo/diclorometano com polaridade crescente. O composto esperado **7** foi obtido na forma de um sólido rosa.

$$\eta = 96\% (0,100 \text{ g})$$

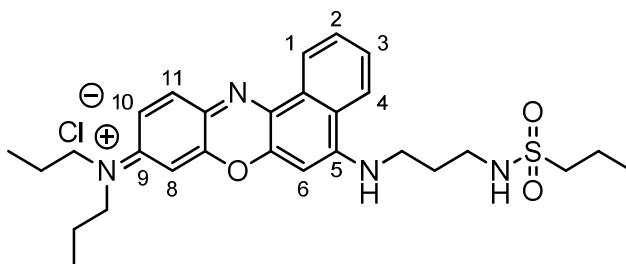
$$R_f = 0,62 \text{ (diclorometano/metanol 9:1)}$$

δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) 1,10 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,94-2,05 (m, 2H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,55-3,63 (m, 2H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7,52-7,68 (m, 4H, H-3, H-2, H-6 e H-7) 7,92 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-4), 7,99 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-8), 8,16 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-5) ppm.

δ_{C} (CDCl_3 , 100,6 MHz) 12,57 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 16,61 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 56,78 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 123,26 (C-5), 125,63 (C-8a), 126,66 (C-6), 127,74 (C-3), 128,37 (C-4), 130,03 (C-2), 130,58 (C-7), 130,85 (C-8), 132,21 (C-4a), 134,15 (C-1) ppm.

3.5 Síntese dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio 8a-e, 9a-d e 10a-d

[8a] Cloreto de *N*-propil-*N*-(5-((3-(propilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-âminio



A uma solução de hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a** (0,191 g, $8,59 \times 10^{-4}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL) foi adicionado ácido clorídrico concentrado (0,232 mL) e *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a** (0,131 g, $4,29 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e refluxou-se num banho de óleo, com agitação, durante 21 horas. O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 95:5). O solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de diclorometano/metanol com polaridade crescente. O composto **8a** foi obtido na forma de um sólido azul.

$$\eta = 33\% (0,078 \text{ g})$$

$$R_f = 0,48 \text{ (diclorometano/metanol 95:5)}$$

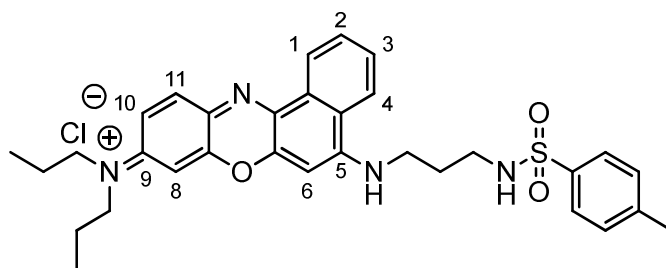
$$p.f. = 214,5-216,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3417, 3170, 2958, 2927, 2869, 1638, 1584, 1546, 1493, 1451, 1432, 1383, 1332, 1291, 1237, 1209, 1163, 1131, 1102, 1056, 1010, 820, 776, 725 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,02-1,12 (m, 9H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ e $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,75-1,87 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ e $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,07-2,17 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,09 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,25-3,33 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,63 (t, $J = 8,0$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,85 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 6,90 (s, 1H, H-8), 7,00 (s, 1H, H-6), 7,30 (dd, $J = 9,6$ e $2,0$ Hz, 1H, H-10), 7,83 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-3), 7,88 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-11), 7,94 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-2), 8,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-4), 8,92 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 11,44 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 13,25 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 18,41 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 21,81 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 30,24 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 41,33 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 42,99 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 54,45 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 54,59 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 94,48 (C-6), 97,19 (C-8), 117,04 (C-10), 123,83 (C-4), 124,75 (Ar-C), 125,63 (C-1), 130,94 (C-3), 131,90 (Ar-C), 132,65 (Ar-C), 132,99 (C-2), 134,10 (C-11), 134,99 (Ar-C), 149,72 (Ar-C), 153,30 (Ar-C), 156,22 (C-9), 159,34 (C-5) ppm.

[8b] Cloreto de *N*-(5-((3-(4-metilfenilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-amínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a** (0,080 g, $3,1 \times 10^{-4}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,070 mL) e solução de 4-metil-*N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)benzenossulfonamida **6b** (0,055 g, $1,55 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **8a** (14 horas de refluxo). O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 95:5) e o composto **8b** foi obtido na forma de um sólido azul.

η = 40% (0,037 g)

R_f = 0,52 (diclorometano/metanol 95:5)

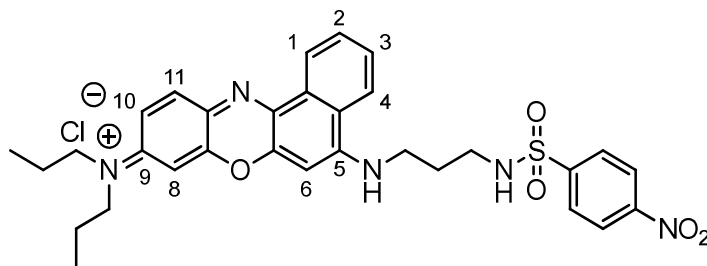
p.f. = >300 °C

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3436, 3207, 3062, 2963, 2931, 2874, 1641, 1587, 1547, 1497, 1452, 1437, 1384, 1332, 1290, 1240, 1159, 1135, 1097, 1008, 964, 918, 869, 816, 773, 726 cm⁻¹.

δ_{H} (CD₃OD, 400 MHz) 1,08 (t, J = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 1,80 (sext, J = 7,2 Hz, 4H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 2,05 (s alargado, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NHSO₂), 2,38 (s, 3H, Ph-CH₃), 3,06 (s alargado, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NHSO₂), 3,60 (t, J = 8,0 Hz, 4H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 3,74 (s alargado, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NHSO₂), 6,77 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 6,79 (s, 1H, H-6), 7,23 (dd, J = 9,6 e 2,4 Hz, 1H, H-10), 7,34 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2×Ar-H *o*-CH₃), 7,71-7,76 (m, 4H, H-3, H-11 e 2×Ar-H *m*-CH₃), 7,84 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-2), 8,20 (s alargado, 1H, H-4), 8,69 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD₃OD, 100,6 MHz) 11,48 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 21,43 (Ph-CH₃), 21,87 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 29,56 (NHCH₂CH₂CH₂NHSO₂), 41,58 (NHCH₂CH₂CH₂NHSO₂), 43,18 (NHCH₂CH₂CH₂NHSO₂), 54,64 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 94,42 (C-6), 97,17 (C-8), 117,04 (C-10), 123,81 (C-4), 124,55 (Ar-C), 125,43 (C-1), 128,08 (2×Ar-H *m*-CH₃), 130,80 (2×Ar-H *o*-CH₃), 130,84 (C-3), 131,69 (Ar-C), 132,26 (Ar-C), 132,90 (C-2), 134,01 (C-11), 134,59 (Ar-C), 138,45 (C-SO₂), 144,83 (C-CH₃), 149,44 (Ar-C), 152,79 (Ar-C), 156,13 (C-9), 158,99 (C-5) ppm.

[8c] Cloreto de *N*-(5-((3-(4-nitrofenilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-aminio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a** (0,062 g, $2,4 \times 10^{-4}$ mol, 1,5 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,055 mL) e *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)-4-nitrobenzenossulfonamida **6c** (0,060 g, $1,6 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **8a** (23 horas de refluxo). O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 95:5) e obteve-se o composto **8c** na forma de um sólido azul.

η = 23% (0,023 g)

R_f = 0,82 (DCM:MeOH 95:5)

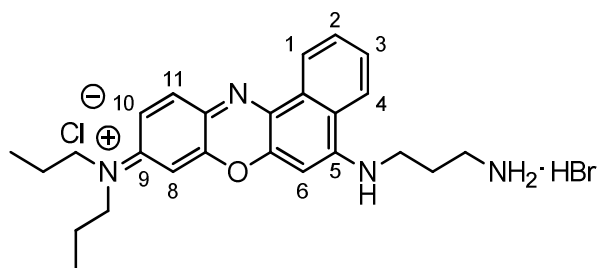
p.f. = 236,1-238,0 °C

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3410, 3190, 3055, 2962, 2935, 2876, 1640, 1589, 1547, 1529, 1495, 1453, 1436, 1383, 1331, 1293, 1239, 1161, 1136, 1100, 1059, 1011, 962, 888, 854, 820, 777, 743 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,08 (t, J = 7,2 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1,68-1,88 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,00-2,10 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,18 (t, J = 6,4 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,57-3,70 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,77 (t, J = 6,8 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 4,60 (s alargado, 2H, $2 \times \text{NH}$), 6,91 (s, 1H, H-6), 6,98 (s, 1H, H-8), 7,36 (d, J = 9,6 Hz, 1H, H-10), 7,86 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-3), 7,93-7,99 (m, 2H, H-2 e H-11), 8,08 (d, J = 8,8 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H } m\text{-NO}_2$), 8,33 (d, J = 8,8 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H } o\text{-NO}_2$), 8,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 8,98 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 11,42 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 21,81 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 30,76 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 41,52 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 42,90 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 54,63 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 94,36 (C-6), 97,23 (C-8), 117,32 (C-10), 123,82 (C-4), 124,75 (Ar-C), 125,45 ($2 \times \text{Ar-C } o\text{-NO}_2$), 125,72 (C-1), 129,44 ($2 \times \text{Ar-C } m\text{-NO}_2$), 130,96 (C-3), 132,30 (Ar-C), 132,76 (Ar-C), 133,06 (C-2), 134,27 (C-11), 134,89 (Ar-C), 147,60 (Ar-C), 149,93 (Ar-C), 151,35 (Ar-C), 153,33 (Ar-C), 156,46 (C-9), 159,31 (C-5) ppm.

[8d] Hidrobrometo de cloreto de *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-aminio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a** (0,726 g, $2,8 \times 10^{-3}$ mol, 10 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (1,078 mL) e hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,079 g, $2,8 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **8a** (12 horas de refluxo). Adicionou-se novamente hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,026 g, $9,3 \times 10^{-5}$ mol, 0,33 eq.) e refluxou-se por mais 18 horas. O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 8:2) e o composto **8d** foi obtido na forma de um sólido azul.

η = 18% (0,035 g)

R_f = 0,87 (diclorometano/metanol 7:3)

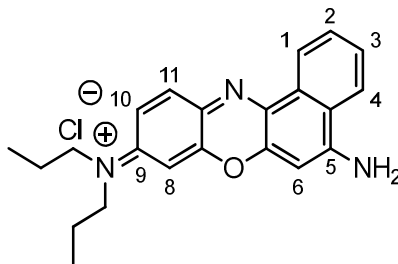
p.f. = 243,2-245,0 °C

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3412, 3201, 2958, 2928, 2865, 1639, 1588, 1548, 1533, 1498, 1436, 1384, 1334, 1290, 1240, 1168, 1126, 1009, 923, 865, 824, 778, 725 cm⁻¹.

δ_{H} (CD₃OD, 400 MHz) 1,10 (t, J = 7,6 Hz, 6H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 1,81 (sext, J = 7,6 Hz, 4H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 2,20-2,32 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂HBr), 3,24 (t, J = 7,6 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂HBr), 3,61 (t, J = 7,2 Hz, 4H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 3,84 (t, J = 7,2 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂HBr), 6,72 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 6,86 (s, 1H, H-6), 7,23 (dd, J = 9,6 e 2,8 Hz, 1H, H-10), 7,61-7,66 (m, 2H, H-3 e H-11), 7,78 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H-2), 8,27 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 8,54 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD₃OD, 100,6 MHz) 11,54 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 21,95 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 27,68 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂HBr), 38,49 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂HBr), 42,63 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂HBr), 54,76 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 94,51 (C-6), 97,20 (C-8), 117,55 (C-10), 124,16 (C-4), 124,19 (Ar-C), 125,17 (C-1), 130,61 (C-3), 131,94 (Ar-C), 131,98 (Ar-C), 132,87 (C-2), 133,97 (Ar-C), 134,06 (C-11), 149,34 (Ar-C), 152,57 (Ar-C), 156,26 (C-9), 158,60 (C-5) ppm.

[8e] Cloreto de *N*-(5-amino-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)-*N*-propilpropan-1-amínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(dipropilamino)-2-nitrosofenol **3a** (0,363 g, $1,4 \times 10^{-3}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,539 mL) e naftalen-1-amina **4** (0,100 g, 7×10^{-4} mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 12 horas; TLC: diclorometano/metanol 9:1). Obteve-se o composto **8e** na forma de um sólido azul.

η = 46% (0,124 g)

R_f = 0,48 (diclorometano/metanol 9:1)

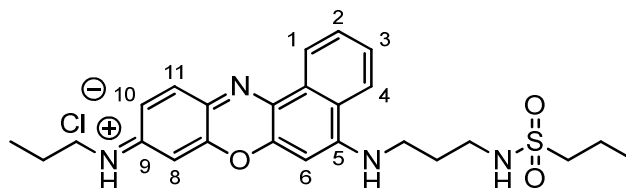
p.f. = 288,0-289,7 °C

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3437, 3031, 2961, 2900, 2869, 1666, 1641, 1585, 1548, 1484, 1425, 1382, 1366, 1333, 1294, 1238, 1191, 1171, 1144, 1114, 1062, 1040, 1008, 923, 858, 818, 779, 748, 728 cm⁻¹.

δ_{H} (CD₃OD, 400 MHz) 1,07 (t, J = 7,6 Hz, 6H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 1,80 (sext, J = 7,6 Hz, 4H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 3,62 (t, J = 8,0 Hz, 4H, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 6,89 (s, 1H, H-6), 6,90 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 7,27 (dd, J = 9,4 e 2,4 Hz, 1H, H-10), 7,85 (t, J = 8,4 Hz, 1H, H-3), 7,88 (d, J = 9,6 Hz, 1H, H-11), 7,97 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H-2), 8,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-4), 8,94 (dd, J = 8,0 e 0,8 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD₃OD, 100,6 MHz) 11,41 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 21,76 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 54,53 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 97,23 (C-8), 97,69 (C-6), 116,64 (C-10), 124,19 (Ar-C), 124,73 (C-4), 125,68 (C-1), 130,88 (C-3), 131,41 (Ar-C), 133,39 (Ar-C), 133,59 (C-2), 134,11 (C-11), 135,29 (Ar-C), 149,62 (Ar-C), 153,18 (Ar-C), 156,17 (C-9), 163,04 (C-5) ppm.

[9a] Cloreto de *N*-(5-((3-(propilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-amínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosofenol **3b** (0,147 g, $8,19 \times 10^{-4}$ mol, 1,5 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,294 mL) e *N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a** (0,167 g, $5,46 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 18 horas; TLC: diclorometano/metanol 9:1). Obteve-se o composto **9a** na forma de um sólido azul.

$$\eta = 27\% (0,039 \text{ g})$$

$$R_f = 0,55 \text{ (diclorometano/metanol 9:1)}$$

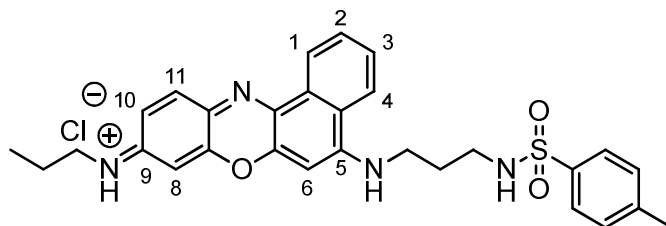
$$p.f. = 193,4-195,4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3437, 3189, 2962, 2917, 2865, 1640, 1587, 1549, 1524, 1499, 1437, 1408, 1384, 1322, 1271, 1187, 1153, 1110, 1076, 1004, 948, 839, 816, 787, 755, 705 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,09 e 1,10 (2xt, $J = 8,4$ Hz, 6H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ e $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,74-1,90 (m, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ e $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,11 (quint, $J = 6,8$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,10 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,29 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,39 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,86 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 6,82 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-8), 7,02 (s, 1H, H-6), 7,30 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-10), 7,80-7,88 (m, 2H, H-3 e H-11), 7,94 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-2), 8,34 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-4), 8,93 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 11,79 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 13,24 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 18,41 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23,03 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30,24 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 41,33 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 42,89 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 46,43 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 54,45 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 94,26 (C-6), 95,53 (C-8), 117,04 (C-10), 123,75 (C-4), 124,76 (Ar-C), 125,57 (C-1), 130,85 (C-3), 132,52 (Ar-C), 132,70 (Ar-C), 132,90 (C-2), 134,13 (Ar-C), 134,43 (C-11), 150,62 (Ar-C), 153,22 (Ar-C), 158,42 (C-9), 159,14 (C-5) ppm.

[9b] Cloreto de *N*-(5-((3-(4-metilfenilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-amínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosofenol **3b** (0,067 g, $3,1 \times 10^{-4}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,059 mL) e 4-metil-*N*-(3-(naftalen-1-ilamino)propil)benzenossulfonamida **6b** (0,055 g, $1,55 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 16 horas; TLC: diclorometano/metanol 95:5). Obteve-se o composto **9b** na forma de um sólido azul.

η = 10% (0,008 g)

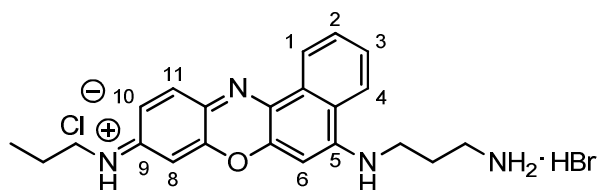
R_f = 0,76 (diclorometano/metanol 95:5)

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3435, 2966, 2928, 2854, 1660, 1641, 1591, 1549, 1530, 1464, 1384, 1322, 1158, 1094 (banda larga), 971, 803 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,10 (t, J = 8,0 Hz, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,79 (sext, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,05 (quint, J = 6,4 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 2,36 (s, 3H, Ph-CH_3), 3,06 (t, J = 6,4 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,38 (t, J = 6,0 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,80 (t, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 6,81 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 6,95 (s, 1H, H-6), 7,14 (dd, J = 9,2 e 2,0 Hz, 1H, H-10), 7,34 (d, J = 8,0 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H } o\text{-CH}_3$), 7,74 (dd, J = 8,4 e 2,0 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H } m\text{-CH}_3$), 7,80-7,86 (m, 2H, H-3 e H-11), 7,94 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-2), 8,32 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-4), 8,91 (dd, J = 8,2 e 1,0 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 11,80 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 21,40 (PhCH_3), 23,05 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29,53 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 41,49 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 42,98 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 46,44 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 94,30 (C-6 e C-8), 112,02 (C-10), 123,76 (C-4), 124,80 (Ar-C), 125,56 (C-1), 128,07 ($2 \times \text{Ar-C } m\text{-CH}_3$), 130,77 ($2 \times \text{Ar-C } o\text{-CH}_3$), 130,86 (C-11), 132,48 (Ar-C), 132,66 (Ar-C), 132,89 (C-2), 134,11 (C-3), 134,42 (Ar-C), 138,50 (C-CH_3), 144,81 (C-SO_2), 153,09 (Ar-C), 158,41 (C-9), 159,09 (C-5) ppm.

[9c] Hidrobrometo de cloreto de *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-amínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosofenol **3b** (0,816 g, $3,76 \times 10^{-3}$ mol, 10 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (1,447 mL) e hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,106 g, $3,8 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 7 horas). Adicionou-se novamente hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,053 g, $1,9 \times 10^{-4}$ mol, 0,5 eq.) e refluxou-se por mais 18 horas. O progresso da reação foi monitorizado por TLC (diclorometano/metanol 8:2) e o composto **9c** foi obtido na forma de um sólido azul.

η = 19% (0,053 g)

R_f = 0,57 (diclorometano/metanol 7:3)

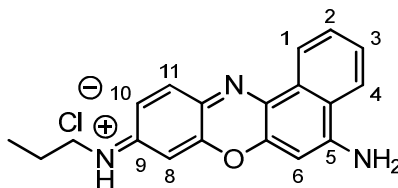
p.f. = >300 °C

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3429, 2966, 2923, 2854, 1660, 1630, 1588, 1549, 1531, 1465, 1349, 1321, 1285, 1184, 1128, 1013, 774 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,04-1,12 (m, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,70-1,81 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,22-2,29 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 3,20 (t, J = 7,6 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 3,45 (t, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,87 (t, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 6,85 (s, 1H, H-8), 6,93 (s, 1H, H-6), 7,11 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H-10), 7,62 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H-11), 7,72 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-3), 7,79-7,87 (m, 1H, H-2), 8,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 8,60 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 11,59 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23,55 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26,56 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 38,35 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 42,97 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 46,49 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 94,14 (C-8), 95,18 (C-6), 113,76 (C-10), 124,49 (C-4), 124,68 (Ar-C), 125,58 (C-1), 130,83 (Ar-C), 131,37 (C-3), 132,16 (Ar-C), 132,64 (C-11), 133,41 (C-2), 135,62 (Ar-C), 152,57 (Ar-C), 152,60 (Ar-C), 158,35 (C-9), 160,20 (C-5) ppm.

[9d] Cloreto de *N*-(5-amino-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)propan-1-aminio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(propilamino)-2-nitrosofenol **3b** (0,408 g, $1,88 \times 10^{-3}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,724 mL) e naftalen-1-amina **4** (0,135 g, $9,4 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 24 horas; TLC: diclorometano/metanol 9:1). Obteve-se o composto **9d** na forma de um sólido azul.

η = 49% (0,157 g)

R_f = 0,41 (diclorometano/metanol 9:1)

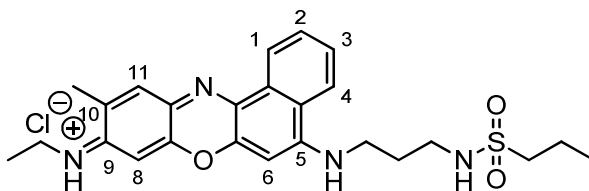
p.f. = >300 °C

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3415, 3204, 3039, 2968, 1663, 1631, 1590, 1553, 1529, 1484, 1468, 1434, 1352, 1286, 1186, 1144, 1119, 1091, 1060, 1013, 977, 853, 792 cm⁻¹.

δ_{H} (CD₃OD, 400 MHz) 1,07 (t, J = 7,2 Hz, 3H, NHCH₂CH₂CH₃), 1,78 (sext, J = 7,2 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 3,51 (t, J = 7,6 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 6,98 (s, 2H, H-6 e H-8), 7,26 (d, J = 9,4 Hz, 1H, H-10), 7,88-7,95 (m, 2H, H-3 e H-11), 8,02 (dt, J = 8,0 e 0,8 Hz, 1H, H-2), 8,39 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-4), 8,96 (dd, J = 8,0 e 0,8 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD₃OD, 100,6 MHz) 11,52 (NHCH₂CH₂CH₃), 23,53 (NHCH₂CH₂CH₃), 46,16 (NHCH₂CH₂CH₃), 98,29 (C-8), 98,86 (C-6), 113,04 (C-10), 124,75 (Ar-C), 125,08 (C-4), 126,09 (C-1), 130,43 (Ar-C), 131,60 (C-3), 132,68 (C-11), 133,29 (Ar-C), 134,21 (C-2), 144,49 (Ar-C), 152,40 (2×Ar-C), 153,01 (C-9), 164,62 (C-5) ppm.

[10a] Cloreto de *N*-(10-metil-5-((3-(propilsulfonamido)propil)amino)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosofenol **3c** (0,071 g, $3,28 \times 10^{-4}$ mol, 1,5 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,118 mL) e *N*-(3-(naftalen-1-

ilamino)propil)propano-1-sulfonamida **6a** (0,067 g, $2,19 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 20 horas; TLC: diclorometano/metanol 9:1). Obteve-se o composto **10a** na forma de um sólido azul.

$$\eta = 44\% (0,048 \text{ g})$$

$$R_f = 0,57 \text{ (diclorometano/metanol 9:1)}$$

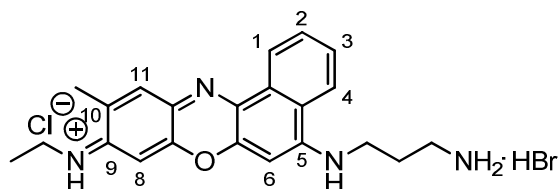
$$p.f. = 141,2\text{--}143,5 \text{ }^\circ\text{C}$$

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3380, 3290, 2975, 2931, 2873, 1641, 1592, 1563, 1544, 1450, 1385, 1313, 1257, 1186, 1140, 1087, 1008, 965, 893, 822, 782 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,05 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,32–1,39 (m, 3H, NHCH_2CH_3), 1,81 (sext, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,05–2,15 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 2,35 (s, 1H, CH_3) 3,02–3,08 (m, 2H, $\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,20–3,30 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 3,50–3,60 (m, 2H, NHCH_2CH_3), 3,80–3,87 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 6,90 (s, 1H, H-8), 7,03 (s, 1H, H-6), 7,75 (s, 1H, H-11), 7,82 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-3), 7,92 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-2), 8,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-4), 8,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 13,21 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14,12 (NHCH_2CH_3), 17,61 (CH_3), 18,39 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30,21 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 39,71 (NHCH_2CH_3), 41,32 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 42,78 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2$), 54,44 ($\text{NHSO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 94,03 (C-6), 94,52 (C-8), 123,68 (C-4), 124,82 (Ar-C), 125,59 (C-1), 128,97 (Ar-C), 130,80 (C-3), 132,44 (Ar-C), 132,69 (C-2), 132,73 (C-11), 132,93 (Ar-C), 134,53 (Ar-C), 149,64 (C-10), 153,15 (Ar-C), 156,92 (C-9), 158,71 (C-5) ppm.

[10b] Hidrobrometo de cloreto de *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-10-metil-9H-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio



Partiu-se de hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosofenol **3c** (0,080 g, $3,1 \times 10^{-4}$ mol, 1,5 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,070 mL) e hidrobrometo de *N*-(naftalen-1-il)propano-1,3-diamina **5** (0,067 g, $2,19 \times 10^{-4}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 17 horas; TLC: diclorometano/metanol 8:2). Obteve-se o composto **10b** na forma de um sólido azul.

η = 56% (0,058 g)

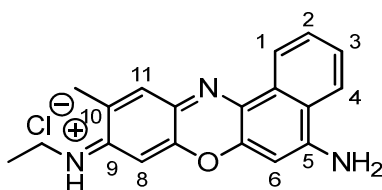
R_f = 0,57 (diclorometano/metanol 7:3)

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr 1%) 3430, 3235, 2970, 2923, 2854, 1642, 1594, 1564, 1549, 1534, 1451, 1323, 1259, 1187, 1166, 1132, 1052, 1010, 880, 774, 709 cm^{-1} .

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,38 (t, J = 7,2 Hz, 3H, NHCH_2CH_3), 2,22-2,32 (m, 5H, CH_2 e $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 3,22 (t, J = 7,6 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 3,47 (q, J = 7,2 Hz, 2H, NHCH_2CH_3), 3,80 (t, J = 6,8 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 6,61 (s, 1H, H-8), 6,84 (s, 1H, H-6), 7,34 (s, 1H, H-11), 7,69 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-3), 7,78 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-2), 8,31 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 8,55 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-1) ppm.

δ_{C} (CD_3OD , 100,6 MHz) 14,20 (NHCH_2CH_3), 17,96 (CH_3), 27,55 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 38,46 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 39,85 (NHCH_2CH_3), 42,48 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$), 94,01 (C-6), 94,45 (C-8), 124,07 (C-4), 124,26 (Ar-C), 125,13 (C-1), 129,08 (Ar-C), 130,56 (C-3), 131,88 (Ar-C), 132,21 (Ar-C), 132,54 (C-2), 132,58 (C-11), 133,48 (Ar-C), 149,03 (C-10), 152,23 (Ar-C), 156,73 (C-9), 158,00 (C-5) ppm.

[10c] Cloreto de *N*-(5-amino-10-metil-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio



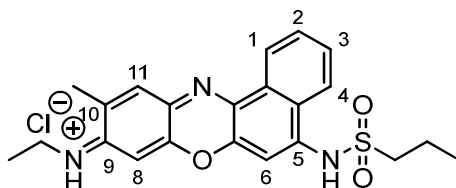
Partiu-se de hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosofenol **3c** (0,464 g, $2,14 \times 10^{-3}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,579 mL) e naftalen-1-amina **4** (0,153 g, $1,07 \times 10^{-3}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a** (tempo de refluxo: 14 horas; TLC: diclorometano/metanol 9:1). Obteve-se o composto **10c** na forma de um sólido azul.

η = 57% (0,206 g)

R_f = 0,45 (diclorometano/metanol 9:1)

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz) 1,39 (t, J = 7,2 Hz, 3H, NHCH_2CH_3), 2,34 (s, 3H, CH_3), 3,49-3,57 (m, 2H, NHCH_2CH_3), 6,84 (s, 1H, H-8), 6,86 (s, 1H, H-6), 7,67 (s, 1H, H-11), 7,83 (t, J = 7,2 Hz, 1H, H-3), 7,94 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-2), 8,31 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-4), 8,91 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1) ppm.

[10d] Cloreto de *N*-(10-metil-5-(propilsulfonamido)-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio



Procedimento 1

Partiu-se de hidrocloreto de 5-(etilamino)-4-metil-2-nitrosofenol **3c** (0,030 g, $1,7 \times 10^{-4}$ mol, 2 eq.) em metanol (3 mL), ácido clorídrico concentrado (0,023 mL) e *N*-(naftalen-1-il)propano-1-sulfonamida **7** (0,030 g, $8,5 \times 10^{-5}$ mol, 1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **8a**. O espectro de RMN de ^1H revelou a presença apenas de reagente de partida, não tendo ocorrido a formação do produto pretendido.

Procedimento 2

Partiu-se de cloreto de *N*-(5-amino-10-metil-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-ilideno)etanamínio **10c** (0,166 g, $4,88 \times 10^{-4}$ mol), trietilamina (0,149 mL, $1,07 \times 10^{-3}$ mol, 2,2 eq.) e cloreto de propano-1-sulfonilo (0,060 mL, $5,37 \times 10^{-4}$ mol, 1,1 eq.) e seguiu-se o procedimento descrito para a preparação de **7**. O espectro de RMN de ^1H revelou a presença apenas de reagente de partida, não tendo ocorrido a formação do produto pretendido.

3.6 Caracterização fotofísica dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

As propriedades de absorção de radiação e emissão de fluorescência dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** foram determinadas em etanol, etanol acidificado com TFA, água e em soluções aquosas a diferentes valores de pH (3, 5, 7,4 e 8,5). Estas soluções foram preparadas usando tampões de ácido bórico, ácido cítrico e fosfato de sódio, ou tampão fosfato-salino PBS (pH 7,4). As concentrações das soluções dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio nos diferentes solventes/meios foi de 10^{-7} a 10^{-5} M.

Os comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e de emissão (λ_{emi}) para cada composto em cada solvente foram obtidos e foram ainda calculados o coeficiente de extinção molar (ϵ), o rendimento quântico de fluorescência relativo (Φ_f) e o desvio de Stokes ($\Delta\lambda$).

A fluorescência foi medida num ângulo de 90° em relação à radiação incidente de excitação, em células de quartzo. O comprimento de onda de excitação foi 590 nm para todos os compostos. A área abaixo da curva do espectro de fluorescência foi determinada, permitindo calcular o rendimento quântico de fluorescência relativo do composto em estudo (Φ_{Fcomp}), utilizando a Oxazina 1 como padrão ($\Phi_f = 0,11$ em etanol), de acordo com a Equação 2, apresentada no capítulo 1.

3.7 Ensaios de atividade antifúngica dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

A concentração inibitória mínima (MIC – *minimum inhibitory concentration*) foi determinada para os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**. Os valores de MIC correspondem à concentração mais baixa de cada composto capaz de induzir uma inibição de pelo menos 80 % do crescimento celular em relação a uma suspensão de células nas mesmas condições, sem composto. Foi seguido o método descrito para os testes de suscetibilidade antifúngica em leveduras (M27-A3, CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*). Nestes ensaios foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo redondo (Jet Biofil®) e meio de cultura RPMI 1640 (HyClone™) com 0,165 M de ácido 3-(*N*-morfolino)propanossulfónico – MOPS (ForMedium), tamponado a pH 7,0 com hidróxido de sódio.

3.7.1 Preparação das suspensões celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

De uma cultura de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072, cultivada em placas de YPD crescida em placas com meio sólido rico (YPDA – 2% de glucose; 1% de peptona; 1% de extrato de levedura e 2% de agar), a 30 °C durante 48 horas, foi retirada biomassa para uma solução aquosa estéril com 0,85% de cloreto de sódio. Determinou-se a concentração de células através de uma câmara de Neubauer de forma a preparar uma solução de células em meio RPMI-1640 com uma concentração de células inicial de $4,5 \times 10^3$ células/mL. Desta forma, depois de uma aplicação de 100 µL desta suspensão seguida da adição de 100 µL das soluções dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** obteve-se uma concentração final de $2,25 \times 10^3$ células/mL em cada poço da microplaca.

3.7.2 Preparação das soluções dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b**

As soluções stock dos compostos **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** (40 mM, 100 µL) foram preparadas em DMSO, tal como as soluções de trabalho com concentrações entre 20 e 0,625 mM. Através de diluições das soluções de trabalho de 1:100 em meio RPMI-1640, foram obtidas concentrações entre 200 a 6,25 µM de composto a testar. Desta forma, as concentrações finais de composto nos poços situaram-se entre 100 a 3,125 µM. A quantidade de DMSO em cada poço foi de 0,5 % (v/v).

3.7.3 Ensaio e leitura

Cada concentração de cloreto de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** foi testada em triplicado, sendo ainda efetuado um branco em duplicado (amostra com composto a testar e meio de cultura, sem células) para cada uma das concentrações, uma vez que os compostos absorvem no comprimento de onda onde se mede a turbidez.

Foram efetuados três controlos: controlo de esterilidade (contendo apenas o meio de cultura), controlo de crescimento (contendo apenas a suspensão celular com a mesma concentração) e controlo de crescimento com DMSO (solução com 0,5% DMSO). Cada um destes controlos foi também efetuado em triplicado.

Após 48 horas de incubação numa câmara, a 30 °C, foram determinados os valores de absorvância em cada poço. Foi utilizado um leitor de microplacas (Biotek Synergy HT) e o comprimento de onda usado foi 640 nm.

4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Os seis novos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-c**, **9a,b** e **10a**, contendo o grupo sulfonamida como substituinte, foram sintetizados com sucesso, com rendimentos de baixos a moderados (10-44 %). Nos seis compostos referidos, o grupo sulfonamida foi introduzido com um grupo propilo como espaçador ligado à amina da posição 5 do sistema policíclico. A tentativa de síntese de um cloreto de benzo[*a*]fenoxazínio com o grupo sulfonilo diretamente ligado à amina da posição 5 **10d** não foi bem sucedida pelo método de síntese utilizado. Os cinco cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8d,e**, **9c,d** e **10b**, sintetizados para comparação, foram também obtidos com sucesso, com rendimentos de baixos a moderados (18-56 %). Foi efetuada a caracterização fundamental de todos os compostos.

A caracterização fotofísica dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** confirma o potencial dos mesmos como possíveis sondas fluorescentes na região NIR. Os estudos de absorção de radiação mostraram que todos os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** apresentam um valor de comprimento de onda de absorção máxima de 609 a 641 nm, em etanol, e de 608 a 656 nm, em água e nas soluções aquosas de pH variável. É possível observar nos espectros de absorção a presença da banda correspondente à forma básica para os compostos **8b**, **8d**, **9c**, **9d** e **10b**, em etanol, e **8b**, **8c** e **9b**, nas soluções aquosas a valores de pH mais elevados (7,4 e 8,5). A formação de agregados H em água é verificada pela presença de um “ombro” nos espectros de absorção de vários compostos em água e nas soluções aquosas.

Os compostos di-alquilados **8a-e** apresentam um desvio batocrômico no valor de comprimento de onda de absorção máxima relativamente aos restantes compostos **9a-d** e **10a,b**, que apresentam apenas uma cadeia alquilica como substituinte na posição 9 do sistema policíclico. Os compostos **8e** e **9d** não possuem substituintes na posição 5 e apresentam um desvio hipsocrômico no valor de comprimento de onda de absorção máxima relativamente aos restantes compostos. Estes dados podem significar que a presença de substituintes tanto na amina da posição 5 como da posição 9 traduzem-se num aumento do valor de λ_{abs} .

A presença do grupo sulfonamida não se traduz em diferenças significativas no valor de λ_{abs} , como observado pela comparação dos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-c**, **9a,b** e **10a**, que possuem este grupo, com os compostos **8d**, **9c** e **10b**, análogos que possuem apenas o grupo propilamina como substituinte na posição 5 do sistema policíclico.

Os estudos de emissão de fluorescência revelam que os onze cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio avaliados emitem fluorescência na região NIR (λ_{emi} 642-671 nm, em etanol; λ_{emi} 649-687 nm, em água e nas soluções aquosas de pH variável). É possível observar um desvio batocrômico dos valores de λ_{emi} em

água, favorecendo a sua possível aplicação como sondas de material biológico. De realçar ainda o desvio batocrômico dos valores de comprimento de onda de emissão máxima dos compostos di-alquilados **8a-e**, tal como observado nos estudos de absorção, relativamente aos compostos mono-alquilados **9a-d** e **10a,b**.

Os rendimentos quânticos de fluorescência são mais elevados em etanol (Φ_f 0,15-0,58) do que em água (Φ_f 0,01-0,21) e nas soluções aquosas de pH variado (Φ_f 0,01-0,37), devido à menor solubilidade dos compostos e à formação de agregados H que não fluorescem. Os compostos mono-alquilados **9a-d** e **10a,b** apresentam de forma geral valores de rendimento quântico de fluorescência superiores (Φ_f 0,30-0,58, em etanol; Φ_f 0,01-0,37, em água e soluções aquosas) aos compostos di-alquilados (Φ_f 0,15-0,20, em etanol; Φ_f até 0,05, em água e soluções aquosas).

Os testes de atividade antifúngica mostram que os cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio **8a-e**, **9a-d** e **10a,b** apresentam atividade antiproliferativa contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072. Os valores de MIC obtidos estão entre 6,25 e 100 μ M para dez dos onze compostos testados (o composto **9b** apresentou atividade antifúngica na concentração de 100 μ M, não atingindo, no entanto, uma inibição de 80% do crescimento celular). Os dados parecem mostrar que a presença do grupo sulfonamida como substituinte nas benzo[*a*]fenoxazinas **8a-c**, **9a** e **10a** não se traduz em melhorias significativas na atividade antifúngica dos compostos (MIC 12,5-50 μ M). É possível observar que não existe uma correlação clara entre os valores de MIC e o coeficiente de partição dos compostos (Log *P*).

Futuramente pretende-se testar a introdução do grupo sulfonamida noutras posições do sistema policíclico e a síntese do composto **10d** (ou análogos com o grupo sulfonamida diretamente ligado à amina da posição 5) por outro método de síntese. A síntese e a caracterização fotofísica de outros derivados de benzo[*a*]fenoxazina com vários substituintes em diferentes posições do sistema policíclico pode estabelecer a correlação entre a presença de mais substituintes e os desvios batocrômicos nos valores de comprimento de onda de absorção e emissão máxima.

Recentemente, as benzo[*a*]fenoxazinas têm vindo a ser estudadas pelo grupo de investigação como possíveis agentes antitumorais. O estudo dos novos cloretos de benzo[*a*]fenoxazínio possuindo um grupo sulfonamida contra linhas celulares tumorais pode potenciar outro tipo de aplicações destes compostos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Baltimore, 2006.
- (2) Karstens, T. Rhodamine B and Rhodamine 101 as Reference Substances for Fluorescence Quantum Yield Measurements. *J. Phys. Chem.* **1980**, 1871–1872.
- (3) Sens, R.; Karl, H. Fluorescence Quantum Yield of Oxazine and Carbazine Laser Dyes. *J. Lumin.* **1981**, 25, 709–712.
- (4) Baeyer, A. Ueber Eine Neue Klasse von Farbstoffen. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1871**, 555–558.
- (5) Bandamwar, K. L.; Papas, E. B.; Garrett, Q. Fluorescein Staining and Physiological State of Corneal Epithelial Cells. *Contact Lens Anterior Eye* **2013**.
- (6) Kakucs, M. D. Fluorescein Angiography in Intracranial Aneurysm Surgery – a Helpful Method to Evaluate the Security of Clipping and to Observe Blood Flow. *World Neurosurg.* **2017**.
- (7) Gonçalves, M. S. T. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 190–212.
- (8) Shimomura, O. Structure of the Chromophore of Aequorea O. Shimomura Green Fluorescent Protein. *Febs Lett.* **1979**, 104 (2), 2–4.
- (9) Wei, L.; Thirumalaivasan, N.; Liao, Y.; Wu, S. Fluorescent Coumarin-Based Probe for Cysteine and Homocysteine with Live Cell Application. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, 183, 204–208.
- (10) Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M. Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4-Difluoro-4-Bora-(3a,4a)-Diaza-s-Indacene. *J Fluoresc* **2009**, 19, 755–758.
- (11) Zhang, Z.; Kwiatkowski, N.; Zeng, H.; Lim, M.; Gray, N. S. Leveraging Kinase Inhibitors to Develop Small Molecule Tools for Imaging Kinases by Fluorescence Microscopy W Z. *Moll. BioSyst.* **2012**, 8, 2523–2526.
- (12) Zhai, J.; Pan, T.; Zhu, J.; Xu, Y.; Chen, J.; Xie, Y.; Qin, Y. Boronic Acid Functionalized Boron Dipyrromethene Fluorescent Probes: Preparation, Characterization, and Saccharides Sensing Applications. *Anal. Chem* **2012**, 84, 10214–10220.
- (13) Stemmer, U.; Ramprecht, C.; Zenzmaier, E.; Rechberger, G.; Kollroser, M.; Hermetter, A. Uptake and Protein Targeting of Fluorescent Oxidized Phospholipids in Cultured RAW 264.7 Macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1821, 706–718.
- (14) Dziuba, D.; Pohl, R.; Hocek, M. Bodipy-Labelled Nucleoside Triphosphates for Polymerase

- Synthesis of Fluorescent DNA. *Bioconjug. Chem.* **2014**, 1–31.
- (15) Meldola, R. Einwirkung von Nitrosodimethylanilin Auf Phenole, Welche Nicht Die Methylgruppe Enthalten. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1879**, No. 12, 2065–2066.
- (16) Lomillo, A.; Ruiz, J. G.; Pasqual, F. J. Biosensor Based on Platinum Chips for Glucose Determination. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 547, 209–214.
- (17) Kubota, L.; Gouvea, F.; Andrade, A.; Milagres, B.; Neto, G. Electrochemical Sensor for NADH Based on Meldola's Blue Immobilized on Silica Gel Modified with Titanium Phosphate. *Electrochim. Acta* **1996**, 41 (9), 1–5.
- (18) Mohlau, R.; Uhlmann, K. Zur Kenntniss Der Chinaxin- Und Oxazinfarbstoffe. *Ber. D. Deutsch. Chem.* **1896**.
- (19) Williams, D. The Mechanism of the Fischer-Hepp Rearrangement of Aromatic *N*-Nitroso-Amines. *Tetrahedron* **1975**, 31 (6), 1343–1349.
- (20) Ho, N.; Weissleder, R.; Tung, C. Development of Water-Soluble Far-Red Fluorogenic Dyes for Enzyme Sensing. *Tetrahedron* **2006**, 62, 578–585.
- (21) Martinez, V.; Henary, M. Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 13764–13782.
- (22) Firmino, A. D. G.; Raju, B. R.; Gonçalves, M. S. T. Microwave Synthesis of Water-Soluble 2-, 5- and 9-Substituted Benzo[*a*]phenoxazinium Chlorides in Comparison with Conventional Heating. *Eur. J. Org. Chem* **2013**, No. 4, 1506–1514.
- (23) Raju, B. R.; Sampaio, D. M. F.; Silva, M. M.; Coutinho, P. J. G.; Gonçalves, M. S. T. Ultrasound Promoted Synthesis of Nile Blue Derivatives. *Ultrason. - Sonochemistry* **2014**, 21 (1), 360–366.
- (24) Naik, S.; Alves, C. M. A.; Coutinho, P. J. G.; Gonçalves, M. S. T. *N*-(Di)icosyl-Substituted Benzo[*a*]phenoxazinium Chlorides: Synthesis and Evaluation as Near-Infrared Membrane Probes. *Eur. J. Org. Chem* **2011**, 2491–2497.
- (25) Frade, V. H. J.; Barros, S. A.; Moura, J. C. V. P.; Gonçalves, M. S. T. Fluorescence Derivatisation of Amino Acids in Short and Long-Wavelengths. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3403–3407.
- (26) Frade, V. H. J.; Sousa, M. J.; Moura, J. C. V. P.; Gonçalves, M. S. T. Synthesis, Characterisation and Antimicrobial Activity of New Benzo[*a*]phenoxazine Based Fluorophores. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8347–8352.
- (27) Wang, B.; Fan, J.; Wang, X.; Zhu, H.; Wang, J.; Mu, H.; Peng, X. A Nile Blue Based Infrared Fluorescent Probe: Imaging Tumors That over-Express Cyclooxygenase-2. *Chem. Commun.*

- 2014**, *51*, 792–795.
- (28) Kanitz, A.; Hartmann, H. Preparation and Characterization of Bridged Naphthoxazinium Salts. *Eur. J. Org. Chem* **1999**, 923–930.
 - (29) Frade, V.; Gonçalves, M.; Coutinho, P.; Moura, J. Synthesis and Spectral Properties of Long-Wavelength Fluorescent Dye. *J. Photochem. Photobiol.* **2007**, *185*, 220–230.
 - (30) Golini, C. M.; Williams, B. W.; Foresman, J. B. Further Solvatochromic, Thermochromic, and Theoretical Studies on Nile Red. *J Fluoresc* **1998**, *8* (4), 395–404.
 - (31) Yew, P. L.; Heng, L. Y. Sensors and Actuators B: Chemical A Reflectometric Ion Sensor for Potassium Based on Acrylic. *Sensors Actuators B. Chem.* **2014**, *191*, 719–726.
 - (32) Siami, E.; Sabzi, R. E.; Rasouli, F. Nile Blue and Nickel Organometallic Dyes Applied in Dye-Sensitized Solar Cells. *Port. Eletrochim. Acta* **2015**, *33* (1), 23–33.
 - (33) Shervedani, R. K.; Amini, A. Preparation of Graphene/Nile Blue Nanocomposite: Application for Oxygen Reduction Reaction and Biosensing. *Electrochim. Acta* **2015**, *173*, 354–363.
 - (34) Huang, M.; He, S.; Liu, W.; Yao, Y.; Miao, S. Spectral Inspections on Molecular Configurations of Nile Blue A Adsorbed on the Elementary Clay Sheets. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 13302–13308.
 - (35) Chubinidze, K.; Partsvania, B.; Sulaberidze, T.; Khushivadze, A.; Davitashvili, E.; Koshoridze, N. Luminescence Enhancement in Nanocomposite Consisting of Polyvinyl Alcohol Incorporated Gold Nanoparticles and Nile Blue 690 Perchlorate. *Appl. Opt.* **2014**, *53* (31), 7177–7181.
 - (36) Wei, R.; Wei, Z.; Sun, L.; Zhang, J. Z.; Liu, J.; Ge, X.; Shi, L. Nile Red Derivative-Modified Nanostructure for Upconversion Luminescence Sensing and Intracellular Detection of Fe³⁺ and MR Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *8* (1), 400–410.
 - (37) Chen, S.; Chang, H.; Road, R. Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (13), 3727–3734.
 - (38) Huang, Y.; Chang, H. Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticle Matrixes for Determining Amino thiols through Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (5), 1485–1493.
 - (39) Lee, K.; Chen, S.; Jeng, J.; Cheng, Y.; Shiea, J. Fluorescence and Interactions with Thiol Compounds of Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *307*, 340–348.
 - (40) Han, W.; Liao, S.; Zhang, C.; Ding, H.; Wu, Z.; Shen, G. Highly Sensitive Fluorometric Assay

- Method for Acetylcholine- Sterase Inhibitor Based on Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles. *Chin. J. Chem.* **2013**, *31*, 1072–1078.
- (41) Hu, M.; Yin, J.; Li, Y.; Zhao, X. Development of a Nile-Blue Based Chemodosimeter for Hg²⁺ in Aqueous Solution and Its Application in Biological Imaging. *J. Fluoresc.* **2015**, *25*, 403–408.
- (42) Duan, R.; Li, C.; Liu, S.; Liu, Z.; Li, Y.; Zhu, J.; Hu, X. A Selective Fluorescence Quenching Method for the Determination of Trace Hypochlorite in Water Samples with Nile Blue A. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2015**, *000*, 1–6.
- (43) Davis, M. M.; Hetzer, H. B. Titrimetric and Equilibrium Studies Using Indicators Related to Nile Blue A. *Anal. Chem* **1966**, *38* (12), 451–461.
- (44) Madsen, J.; Canton, I.; Warren, N. J.; Themistou, E.; Blanz, A.; Ustbas, B.; Tian, X.; Pearson, R.; Battaglia, G.; Lewis, A. L.; et al. Nile Blue-Based Nanosized pH Sensors for Simultaneous Far-Red and Near-Infrared Live Bioimaging. *J. Am. Chem. Soc* **2013**, *135* (39), 14863–14870.
- (45) Greenspan, P.; Mayer, E. P.; Fowler, S. D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 965–973.
- (46) Fowler, S. D.; Greenspan, P. Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the Detection of Neutral Lipid Deposits in Tissue Sections: Comparison with Oil Red O. *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, *33* (8), 833–836.
- (47) Teratanatorn, P.; Hoskins, R.; Swift, T.; Douglas, C. W. I.; Shepherd, J.; Rimmer, S. Binding of Bacteria to Poly(Misopropylacrylamide) Modified with Vancomycin: Comparison of Behavior of Linear and Highly Branched Polymers. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 2887–2899.
- (48) Singh, G.; Chamberlin, A. C.; Zhekova, H. R.; Noskov, S. Y.; Tieleman, D. P. Two-Dimensional Potentials of Mean Force of Nile Red in Intact and Damaged Model Bilayers. Application to Calculations of Fluorescence Spectra. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *12* (1), 364–371.
- (49) Prifti, E.; Reymond, L.; Umabayashi, M.; Hovius, R.; Riezman, H.; Johnsson, K. A Fluorogenic Probe for SNAP-Tagged Plasma Membrane Proteins Based on the Solvatochromic Molecule Nile Red. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 606–612.
- (50) Escoffre, J.; Deckers, R.; Sasaki, N.; Bos, C.; Moonen, C. Mild Hyperthermia Influence on Herceptin® Properties. *Radiol. Oncol.* **2015**, *49* (1), 41–49.
- (51) Kuramitz, H.; Piruska, A.; Halsall, H. B.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical Sensing of the Interaction between Protein and Its Ligand Using the Redox Dye Nile Blue as a Label. *Anal. Chem* **2008**, *80* (24), 9642–9648.

- (52) Mie, Y.; Kowata, K.; Kojima, N.; Komatsu, Y. Electrochemical Properties of Interstrand Cross-Linked DNA Duplexes Labeled with Nile Blue. *Langmuir* **2012**, *28*, 17211–17216.
- (53) Gorodetsky, A. A.; Ebrahim, A.; Barton, J. K. Electrical Detection of TATA Binding Protein at DNA-Modified Microelectrodes. *J. Am. Chem. Soc* **2008**, *130*, 2924–2925.
- (54) Patil, V. S.; Padalkar, V. S.; Phatangare, K. R.; Umape, P. G.; Borase, B. N.; Sekar, N. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Novel (1*H*-Benzo[*d*]imidazole-2-yl)-6-(Diethylamino)-3*H*-One-Xanthene, Phenoxazine, and Oxazine. *J. Heterocycl. Chem.* **2014**, 6–11.
- (55) Shimamoto, T.; Tomoda, A.; Ishida, R. Antitumor Effects of a Novel Phenoxazine Derivative on Human Leukemia Cell Lines in Vitro and in Vivo. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 704–708.
- (56) Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Pepe, S. Antitumor Agents. 5. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Biological Evaluation of Dimethyl-5*H*-Pyridophenoxazin-5-Ones, Tetrahydro-5*H*-Benzopyridophenoxazin-5-Ones, and 5*H*-Benzopyridophenoxazin-5-Ones with Potent Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 5110–5118.
- (57) Frade, V. H. J.; Sousa, M. J.; Moura, J. C. V. P.; Gonçalves, M. S. T. Synthesis of naphtho[2,3-*a*]phenoxazinium Chlorides: Structure–activity Relationships of These Heterocycles and Benzo[*a*]phenoxazinium Chlorides as New Antimicrobials. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3274–3282.
- (58) Leitão, M. I. P. S.; Raju, B. R.; Naik, S.; Coutinho, P. J. G.; João, M. Synthesis and Photophysical Studies of New Benzo[*a*]phenoxazinium Chlorides as Antifungal Agents. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*(35), 3936–3941.
- (59) Silva, A.; Costa, L. M. M.; Brito, F. C. F.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. New Class of Potent Antinociceptive and Antiplatelet 10*H*-Phenothiazine-1-Acylhydrazone Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3149–3158.
- (60) Lin, C.; Shulok, J. R.; Kirley, S. D.; Cincotta, L.; Foley, J. W. Lysosomal Localization and Mechanism of Uptake of Nile Blue Photosensitizers in Tumor Cells. *Cancer Res.* **1991**, *51* (21), 2710–2719.
- (61) Wainwright, M. Non-Porphyrin Photosensitizers in Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 351–359.
- (62) Foley, J. W.; Song, X.; Demidova, T. N.; Jilal, F.; Hamblin, M. R. Synthesis and Properties of Benzo[*a*]phenoxazinium Chalcogen Analogues as Novel Broad-Spectrum Antimicrobial

- Photosensitizers. *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 5291–5299.
- (63) Hirakawa, K.; Ota, K.; Hirayama, J.; Oikawa, S.; Kawanishi, S. Nile Blue Can Photosensitize DNA Damage through Electron Transfer. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 649–655.
- (64) Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Lavecchia, A.; Mazzoni, O.; Novellino, E.; Barone, V.; Pani, A.; Tramontano, E.; Colla, P. La; et al. Antitumor Agents. 1. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of 5*H*Pyrido[3,2-*a*]phenoxazin-5-One, a Compound with Potent Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem* **2002**, *45*, 5205–5216.
- (65) Raju, B. R.; Naik, S.; Coutinho, P. J. G.; Gonçalves, M. S. T. Dyes and Pigments Novel Nile Blue Derivatives as Fluorescent Probes for DNA. *Dye. Pigment.* **2013**, *99*(1), 220–227.
- (66) Alves, C. M. A.; Naik, S.; Coutinho, P. J. G.; Gonçalves, M. S. T. Novel Long Alkyl Side Chain Benzo[*a*]phenoxazinium Chlorides: Synthesis, Photophysical Behaviour and DNA Interaction. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10441–10452.
- (67) Firmino, A. D. G.; Gonçalves, M. S. T. Bifunctionalised Long-Wavelength Fluorescent Probes for Biological Applications. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*(37), 4946–4950.
- (68) Lopes, M.; Tiago, C.; Raju, B. R.; Gonçalves, M. S. T.; Coutinho, P. J. G.; Henriques, M.; Belo, I. Application of Benzo[*a*]phenoxazinium Chlorides in Antimicrobial Photodynamic Therapy of *Candida Albicans* Biofilms. *J. Photochem. Photobiol.* **2014**, *141*, 93–99.
- (69) Bonk, J. D.; Amos, D. T.; Olson, S. J. Convenient One-Pot Synthesis of Sulfonamides from Thiols Using Trichloroisocyanuric Acid. *Synth. Commun. Commun.* **2007**, *37*, 2039–2050.
- (70) Wright, S. W.; Hallstrom, K. N. A Convenient Preparation of Heteroaryl Sulfonamides and Sulfonyl Fluorides from Heteroaryl Thiols. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1080–1084.
- (71) Vleeschauwer, M.; Gauthier, J. Remarkably Mild and Simple Preparations of Sulfinates, Sulfonyl Chlorides and Sulfonamides from Thioanisoles. *Syn. Lett.* **1997**, 375–377.
- (72) Kataoka, T.; Iwama, T.; Setta, T.; Takagi, A. Preparation of Sulfonamides from Sodium Sulfonates: $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{Br}^-$ and $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{Cl}_2^-$ as a Mild Halogenating Reagent for Sulfonyl Bromides and Sulfonyl Chlorides. *Atsuko Synth.* **1998**, *4*, 423–426.
- (73) Chantarasriwong, O.; Jang, O.; Chavasiri, W. A Practical and Efficient Method for the Preparation of Sulfonamides Utilizing $\text{Cl}_3\text{CCN}/\text{PPh}_3$. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7489–7492.
- (74) Lai, J. Y. Q.; Ferguson, Y.; Jones, M. Preparation of Substituted Quinoliny and Isoquinoliny Sulfonyl Chlorides for the Synthesis of Novel Sulfonamides. *Synth. Commun.* **2003**, *19*, 3427–3433.

- (75) Gennari, C.; Longari, C.; Ressel, S.; Salom, B.; Mielgo, A. Synthesis of Chiral Vinylogous Sulfonamidopeptides (vs-Peptides). *Eur. J. Org. Chem* **1998**, 945–959.
- (76) Farrar, W. Arylamides of Halogenated Methane- and Ethane-Sulphonic Acids. *J. Chem. Soc.* **1952**, 3058–3062.
- (77) Glass, R.; Swedo, R. Preparation of Trichloromethanesulfonamides via Trichloromethanesulfenamides. *Synth. Commun.* **1977**, 798–800.
- (78) Tasaka, A.; Teranishi, K.; Matsushita, Y.; Tamura, N.; Hayashi, R.; Okonogi, K.; Itoh, K. Optically Active Antifungal Azoles. III. Synthesis and Antifungal Activity of Sulfide and Sulfonamide Derivatives of (2R,3R)-2-(2,4-Difluorophenyl)-3-Mercapto-1-(1H-1,2,4-Triazol-1-yl)-2-Butanol. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 82, 85–94.
- (79) Caddick, S.; Wilden, J. D.; Judd, D. B. Direct Synthesis of Sulfonamides and Activated Sulfonate Esters from Sulfonic Acids. *J. Am. Chem. Soc* **2004**, 126, 1024–1025.
- (80) Wilden, J. D.; Geldeard, L.; Lee, C. C.; Judd, B.; Caddick, S. Trichlorophenol (TCP) Sulfonate Esters: A Selective Alternative to Pentafluorophenol (PFP) Esters and Sulfonyl Chlorides for the Preparation of Sulfonamides. *Chem. Commun.* **2007**, 1074–1076.
- (81) Chan, D. M. T.; Wang, R.; Winters, M. P. New *N*- and *O*-Arylations with Phenylboronic Acids and Cupric Acetate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2933–2936.
- (82) Deng, W.; Liu, L.; Zhang, C.; Liu, M.; Guo, Q. Copper-Catalyzed Cross-Coupling of Sulfonamides with Aryl Iodides and Bromides Facilitated by Amino Acid Ligands. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7295–7298.
- (83) Liu, S.; Yu, Y.; Liebeskind, L. S. N-Substituted Imines by the Copper-Catalyzed *N*-Elimination of Boronic Acids and Organostannanes with *O*-Acyl Ketoximes. *Org. Lett.* **2007**, 9(10), 1947–1950.
- (84) Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *J. Am. Chem. Soc* **1994**, No. 14, 5969–5970.
- (85) Guram, A.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in Situ Generated Amino Tannanes. *J. Am. Chem. Soc* **1994**, 116, 7901–7902.
- (86) Ashfaq, M.; Shoaib, S.; Shah, A.; Najjam, T.; Shaheen, S. Synthetic Routes of Sulfonamide Derivatives : A Brief Review. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2013**, 10 (2), 160–170.
- (87) Alsughayer, A.; Elassar, A. A.; Mustafa, S.; Sagheer, F. Al. Synthesis , Structure Analysis and Antibacterial Activity of New Potent Sulfonamide Derivatives. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2011**,

- 2011 (April), 144–149.
- (88) Ozbek, N.; Katirciog, H.; Karacan, N.; Baykal, T. Synthesis , Characterization and Antimicrobial Activity of New Aliphatic Sulfonamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5105–5109.
- (89) Domagk, G. Ein Beitrag Zur Chemotherapie Der Bakteriellen Infektionen. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **1935**, No. 7, 250–253.
- (90) Mishra, S.; Karmodiya, K.; Surolia, A. Synthesis and Exploration of Novel Curcumin Analogues as Anti-Malarial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2894–2902.
- (91) Braga, M.; Leal, P.; Carvalho, J.; Meireles, M. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma Longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6604–6611.
- (92) Kohli, K.; Ali, J.; Ansari, M.; Raheman, Z. Curcumin: A Natural Antiinflammatory Agent. *Indian J. Pharmacol.* **2005**, *3*, 141–147.
- (93) Arun, N.; Nalini, N. Efficacy of Turmeric on Blood Sugar and Polyol. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2002**, *57*, 41–52.
- (94) Roush, W. R.; Li, S. L. G.; Cheng, J.; Scheidt, K. A.; Mckerrow, J. H.; Hansell, E.; Francisco, S.; May, R. V. Vinyl Sulfonate Esters and Vinyl Sulfonamides: Potent, Irreversible Inhibitors of Cysteine Proteases. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, No. 120, 10994–10995.
- (95) Scozzafava, A.; Owa, T.; Supuran, C. T. Anticancer and Antiviral Sulfonamides. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*(11), 925–953.
- (96) Vullo, D.; Franchi, M.; Gallori, E.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Pastorekova, S.; Supuran, C. T.; Bioinorganica, C.; Lastruccia, V. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of the Tumor-Associated Isozyme IX with Aromatic and Heterocyclic Sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1005–1009.
- (97) Fisherman, J. S.; Osborn, B. L.; Chun, H. G.; Plowman, J.; Smith, A. C.; Christian, M. C.; Zaharko, D. S.; Shoemaker, R. H. Chloroquinoxaline Sulfonamide: A Sulfanilamide Antitumor Agent Entering Clinical Trials. *Invest. New Drugs* **1993**, *11*, 1–9.
- (98) Yoshino, H. Novel Sulfonamides as Potential, Systemically Active Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* **1992**, No. 9, 2496–2497.
- (99) Ozawa, Y.; Sugi, N. H.; Nagasu, T.; Owa, T.; Watanabe, T.; Koyanagi, N.; Yoshino, H.; Kitoh, K.; Yoshimatsu, K. E7070, a Novel Sulphonamide Agent with Potent Antitumour Activity in Vitro and in Vivo. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 2275–2282.

- (100) Dittrich, C.; Zandvliet, A. S.; Gneist, M.; Huitema, A. D. R.; King, A. A. J.; Wanders, J. A Phase I and Pharmacokinetic Study of Indisulam in Combination with Carboplatin. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 559–566.
- (101) Yoshimatsu, K. Mechanism of Action of E7010, an Orally Active Sulfonamide Antitumor Agent: Inhibition of Mitosis by Binding to the Colchicine Site of Tubulin. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3208–3213.
- (102) Tung, R.; Livingston, D.; Rao, B. Design and Synthesis of Amprenavir, a Novel HIV Protease Inhibitor. In *Protease inhibitors in AIDS therapy*, Flexner, C., Ed.; 2001; pp 101–118.
- (103) Chrusciel, R.; Thaisrivongs, S.; Nicholas, J. HIV Protease Inhibitors in Early Development. In *Protease inhibitors in AIDS therapy*, Flexner, C., Ed.; 2001; pp 119–137.
- (104) Calculation of molecular properties <http://www.molinspiration.com>, acessado em 24 de julho de 2018.